



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

“DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SU ASOCIACIÓN CON EL
CARCINOMA *IN SITU* TESTICULAR”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

LUCERO CORTÉS TRUJILLO

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ASESOR INTERNO

Dra. María Elena Ayala Escobar
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

México D.F., diciembre 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SU ASOCIACIÓN
CON EL CARCINOMA *IN SITU* TESTICULAR.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

“DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SU ASOCIACIÓN
CON EL CARCINOMA *IN SITU* TESTICULAR”.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGO

P R E S E N T A:

LUCERO CORTES TRUJILLO.

DIRECTOR: DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR.

ASESOR: MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR.



AGRADECIMIENTOS.

A mi tutora de tesis la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, jefa del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría, por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de esta tesis, por su apoyo, su amistad y paciencia. Le agradezco la oportunidad y confianza que me brindó, por hacer de mi una mejor persona.

Al la Dra. María Elena Ayala Escobar, por su apoyo y colaboración en la realización de esta tesis.

A cada uno de los sinodales, que me apoyaron en mi formación académica y en la realización de este trabajo.

Dr. Benny Weiss Steider.

Dra. María Esther Cruz Beltrán.

M. C. Raúl Zavala Chavero.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM).

Al jefe del departamento de patología del Instituto Nacional de Pediatría el Dr. Daniel Carrasco Daza, por su apoyo y colaboración en la realización de este proyecto.

Así mismo, con admiración y cariño a Francisco García y a Eduardo del Dpto. de Patología del Instituto Nacional de Pediatría, por su apoyo, para mi fueron una parte muy importante de este proyecto, ya que me brindaron las herramientas necesarias tanto en conocimiento como en material y reactivos. Les agradezco su amistad y confianza, disfruté cada día que conviví con ustedes, en los cuales además de aprender, me divertí.



DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SU ASOCIACIÓN CON EL CARCINOMA *IN SITU* TESTICULAR.



Al Dr. Jaime Cárdenas Camacho Subdirector de Servicios Periciales del Instituto de Ciencias Forenses, al Dr. Felipe E. Takajashi Medina Director del Instituto de Ciencias Forenses, por las facilidades otorgadas y al Técnico en necropsias, José Luis Vargas Estrada por apoyarnos con la toma de muestras para la realización de esta tesis.

A cada uno de los integrantes del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría, el Dr. Oscar Gutiérrez, el Dr. Julio Rojas y la Dra. Margarita Chávez por su apoyo para la realización de este proyecto. Les agradezco su amistad y compañía. Al señor Pedro, a Edgar y a Rocío por su apoyo durante la realización de esta tesis, gracias por su amistad y buenos consejos.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Paola, Carlos, Daniel, Cynthia e Iris por los buenos momentos de relax, gracias por su ayuda incondicional.



DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SU ASOCIACIÓN
CON EL CARCINOMA *IN SITU* TESTICULAR.



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción y en el Depto. de Patología del Instituto Nacional de Pediatría. La tesis se llevo a cabo con el apoyo financiero del proyecto 64/2010 de Fondos Federales, del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, el proyecto 162006 del CONACYT y de la beca PROBEI de la C.C.I.N.S.H.A.E (Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de alta especialidad).



DEDICATORIA

A ti papá, Miguel Cortés, por ser la persona más importante en mi vida, por darme todo tu amor y cariño, por guiarme y darme tus bendiciones. Gracias por tu confianza y apoyo, por todo lo que me diste y me enseñaste. Este camino recorrido fue difícil sin tu presencia pero sin duda alguna lleno de éxito por que sé que estarás siempre a mi lado acompañándome en cada paso que dé.

A ti mamá, Lourdes Trujillo, por ser como eres, por que gracias a ti soy diferente, por que me has enseñado que con fortaleza, dedicación y esfuerzo, todo se puede lograr. Te admiro por ser tan trabajadora, por lo que has hecho en tu vida y por hacer de mí y de mis hermanos una mejor familia.

A mis hermanos Lili y Ellioth, por su apoyo, comprensión y cariño, por los regaños y por todos los momentos felices que me hicieron pasar. Los admiro y los quiero mucho.

A mi novio Ricardo Tonatiuh, por estar en mi vida, por ser mi amigo, compañero y todo lo que me hace feliz, agradezco que los momentos difíciles los convirtieras en risas, agradezco tu comprensión al dedicarte poco tiempo y aun así me siguieras queriendo mucho.

A mis amigos Lalo y Bere, por estar con migo cuando los necesité, por apoyarme y preocuparse por mí. Gracias por su amistad.



ÍNDICE	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....	2
1.2 ETAPAS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....	2
a) Diferenciación gonadal.....	2
b) Diferenciación fenotípica.....	6
1.3 MECANISMO DE DESCENSO TESTICULAR.....	8
1.4 DIFERENCIACIÓN, MADURACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TESTICULARES POSTNATALES.....	11
1.4.1 CÉLULAS DE SERTOLI.....	11
1.4.2 CÉLULAS DE LEYDIG.....	13
1.4.3 GONOCITOS.....	17
a) NCAM.....	18
b) SCF.....	18
c) c-Kit.....	19
d) STPB-C.....	19
e) PDGF.....	19
f) OCT3/4.....	20
g) AP2y.....	21
h) NANOG.....	22
i) FA.....	23
1.5 CRIPTORQUIDIA.....	28
1.5.1 INCIDENCIA Y CLASIFICACIÓN.....	29
1.5.2 ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO.....	30
1.5.3 FACTORES ENDÓCRINOS.....	30
1.5.4 FACTORES ANATÓMICOS.....	32
1.5.5 FACTORES GENÉTICOS.....	33
1.5.6 EFECTOS A LARGO PLAZO.....	34
1.6 CÁNCER TESTICULAR.....	36
1.6.1 CIST.....	38
1.6.2 ETIOLOGÍA DEL SEMINOMA.....	40
2. JUSTIFICACIÓN.....	43
3. HIPÓTESIS.....	44
4. OBJETIVO GENERAL.....	44
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
6.1 Consideraciones éticas.....	45
6.2 Criterios de inclusión.....	45
6.3 Criterios de exclusión.....	45
6.4 Inmunohistoquímica (IHQ).....	46
6.5 Estandarización de la técnica.....	46
6.6 Análisis semicuantitativo.....	48
6.7 Estadística descriptiva.....	48
6.8 Análisis Morfométrico.....	49
6.9 Análisis Histopatológico.....	49
7. RESULTADOS.....	50
7.1 Grupo de 0 a 1 año de edad.....	50
Inmunoreactividad.....	50
OCT3/4.....	51



DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SU ASOCIACIÓN CON EL CARCINOMA *IN SITU* TESTICULAR.



<i>c-Kit</i>	53
<i>FA</i>	55
<i>Morfometría</i>	59
<i>Histopatología</i>	60
7.2 Grupo de 2 a 10 años de edad.....	62
<i>Inmunoreactividad</i>	62
<i>OCT3/4</i>	62
<i>c-Kit</i>	64
<i>FA</i>	66
<i>Morfometría</i>	67
<i>Histopatología</i>	68
7.3 Grupo de 11 a 15 años de edad.....	70
<i>Inmunoreactividad</i>	70
<i>OCT3/4</i>	70
<i>c-Kit</i>	71
<i>FA</i>	73
<i>Morfometría</i>	75
<i>Histopatología</i>	75
7.4 Grupo de 16 a 18 años de edad.....	77
<i>Inmunoreactividad</i>	77
<i>OCT3/4</i>	77
<i>c-Kit</i>	77
<i>FA</i>	79
<i>Morfometría</i>	80
<i>Histopatología</i>	81
8. DISCUSIÓN.....	84
9. CONCLUSIONES.....	102
10. BIBLIOGRAFÍA.....	103



FIGURAS

	Página
Figura 1: Sitio de origen de las CGP en la pared del saco vitelino en un embrión de 3 semanas	4
Figura 2: Formación de crestas genitales y conductos paramesonéfricos.....	5
Figura 3: Desarrollo del testículo.....	7
Figura 4: Fases del descenso testicular.....	8
Figura 5: Linaje de las células de Leydig.....	15
Figura 6: Líneas de tiempo para el desarrollo de los gonocitos en ratones, ratas y humanos....	26
Figura 7: Posición del testículo criptorquídeo.....	30
Figura 8: Histología del CIS.....	39
Figura 9: Estructura anatómica e histológica del seminoma.....	40
Figura 10: Controles positivos para cada uno de los anticuerpos utilizados.....	47
Figura 11: Análisis semicuantitativo para inmunoreactividad.....	48
Figura 12: Marcador de pluripotencialidad OCT3/4 de 0 a 1 años de edad.....	53
Figura 13: Marcador de pluripotencialidad c-Kit de 0 a 1 años de edad.....	55
Figura 14: Marcador de indiferenciación FA de 0 a 1 años de edad.....	57
Figura 15: Alteraciones en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia de 0 a 1 año de edad.....	61
Figura 16: Marcador de pluripotencialidad OCT3/4 de 2 a 10 años de edad.....	63
Figura 17: Marcador de pluripotencialidad c-Kit de 2 a 10 años de edad.....	65
Figura 18: Marcador de indiferenciación FA de 2 a 10 años de edad.....	67
Figura 19: Alteraciones en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia de 2 a 10 años de edad.....	69
Figura 20: Marcador de pluripotencialidad OCT3/4 de 11 a 15 años de edad.....	71
Figura 21: Marcador de pluripotencialidad c-Kit de 11 a 15 años de edad.....	72
Figura 22: Marcador de indiferenciación FA de 11 a 15 años de edad.....	74
Figura 23: Alteraciones en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia de 11 a 15 años de edad.....	76
Figura 24: Marcador de pluripotencialidad OCT3/4 de 16 a 18 años de edad.....	78
Figura 25: Marcador de pluripotencialidad c-Kit de 16 a 18 años de edad.....	79
Figura 26: Marcador de indiferenciación FA de 16 a 18 años de edad.....	80
Figura 27: Alteraciones en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia de 16 a 18 años de edad.....	82
Figura 28: Tejido testicular de un paciente de 15 años de edad, donde se muestra que las mismas células que son positivas a c-Kit también lo son para FA.....	83
Figura 29: Probable mecanismo de transformación (células de Sertoli y gonocitos).....	89
Figura 30: Probable mecanismo de transformación (OCT3/4).....	93
Figura 31: Probable mecanismo de transformación (c-Kit y FA).....	98
Figura 32: Probables vías de transformación del gonocito a célula del CIS.....	101



TABLAS Y GRÁFICAS

	Página
Tabla 1: Clasificación de tumores de células germinales según la OMS.....	37
Tabla 2: Lista de proteínas que se expresan en células del CIST.....	42
Tabla 3: Expresión de marcadores de pluripotencialidad (OCT3/4, c-Kit y FA).....	51
Tabla 4: Características particulares de pacientes positivos a OCT3/4, c-Kit y FA.....	58
Gráfica 1: Comparación de áreas de los cordones/tubos seminíferos de pacientes controles vs pacientes criptorquídicos positivos y negativos a las proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación.....	60



ABREVIACIONES

CGP: Células germinales primordiales

MIS: Sustancia inhibidora de los conductos de Müller

INSL3: Factor asociado a la insulina-3

LSC: Ligamento suspensor craneal

NGF: Nervio genitofemoral

NCAM: Molécula de adhesión neuronal

SCF: Factor de células *stem*

c-Kit: Receptor de SCF

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

Oct3/4: Factor de transcripción que regula la pluripotencialidad de las CGP

AP2 γ : Factor de transcripción activador de la proteína-2

FA: Fosfatasa alcalina

NANOG: Factor de transcripción que mantiene la pluripotencialidad de las CGP

TDS: Síndrome de Disgenesia testicular

CIS_t: Carcinoma *in situ* testicular

TGCT: Tumor de células germinales testiculares

IHQ: Inmunohistoquímica

SBEP: Sistema de biotina-estreptavidina/peroxidasa

SBEFA: Sistema de biotina-estreptavidina/fosfatasa



RESUMEN

La criptorquidia representa el principal factor de riesgo de cáncer testicular en la edad adulta. Se sabe que en niños con criptorquidia no se lleva a cabo la diferenciación del gonocito a espermatogonia que normalmente se presenta en el segundo y cuarto mes de edad. Se ha reportado que el seminoma procede de un precursor común, el CISt. La hipótesis más probable es que el inicio de la transformación maligna se lleva a cabo en el útero durante el desarrollo temprano de las células madre de la línea germinal y la célula diana, probablemente un gonocito. Esta hipótesis se basa inicialmente en la semejanza morfológica entre las células CISt y los gonocitos, algunos estudios han demostrado superposición de patrones de expresión de varias proteínas entre gonocitos fetales y células CISt como son: c-Kit, OCT3/4, AP-2 γ y Fosfatasa alcalina (FA), que no son detectables en los testículos adultos. En el presente estudio se analizaron 41 tejidos testiculares con criptorquidia y 30 tejidos testiculares controles, procedentes del Departamento de Patología del INP. Por inmunohistoquímica se analizó la presencia de marcadores de pluripotencialidad e indiferenciación como OCT3/4, c-Kit y FA. Además se realizó un análisis morfométricos en H-E. En individuos del grupo control, la expresión de las proteínas OCT3/4, c-Kit y FA se regulan a la baja desde el nacimiento hasta los cuatro a seis meses de edad, de tal manera que después de los 6 meses de edad ya no se expresan estos marcadores, proceso que determina la diferenciación del gonocito a espermatogonia. En cuanto a la histología de estos controles no presentó ninguna alteración en el epitelio germinal. En los pacientes con criptorquidia, se presentaron alteraciones histopatológicas, las cuales no estuvieron asociadas a la expresión de marcadores (OCT3/4, c-Kit y FA), algunos gonocitos de pacientes con criptorquidia se mantienen como pluripotentes indiferenciados, expresando las proteínas ya mencionadas.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Durante la gestación, en la diferenciación sexual se llevan a cabo una serie de procesos que son determinados y regulados por gran número de genes que codifican para la síntesis de factores de transcripción, factores de crecimiento, enzimas y hormonas. En el hombre el sexo del embrión se determina en tres etapas: en la primera se establece el sexo cromosómico en el momento de la fecundación, en la segunda se presenta la diferenciación de la gónada hacia ovario o testículo y durante la tercera ocurre la diferenciación de los genitales internos y externos, que son influenciados por las hormonas (esteroides, estrógenos ó ambas) involucradas en este proceso de diferenciación sexual (Mora, 1994; Rey y Josso, 1996; Josso, 1998 y Warne y Zajac, 1998).

1.2 ETAPAS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

El establecimiento del sexo cromosómico se presenta cuando un espermatozoide portador de un cromosoma X ó Y fertiliza a un óvulo (portador de un cromosoma X) para dar origen a un embrión con un complemento cromosómico XX o XY. La presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva (Ford et al, 1959).

A) Diferenciación gonadal.

En esta etapa se define la vía que seguirá el embrión indiferenciado para ser un individuo sexualmente dimórfico, si el sexo cromosómico del embrión es XY, la cresta gonadal bipotencial se organiza para la formación de un testículo, y si el complemento cromosómico es XX la cresta gonadal desarrollará ovarios en lugar de testículos (Behringer, 1994). Sin embargo la determinación gonadal no es un evento sencillo, sino crítico, debido a que determina la vía a seguir y el establecimiento de la etapa fenotípica u hormonal que decide los siguientes



eventos para la formación de una gónada femenina o masculina (Söder, 2007). El desarrollo gonadal se inicia con el establecimiento del primordio gonadal o gónada indiferenciada. En la cuarta semana del desarrollo del humano, se observa una estructura primordial común en mujeres y varones llamada cresta urogenital, que se localiza en la superficie ventromedial del mesonéfros, y se origina a partir de células mesenquimatosas somáticas del mesonéfros, y de la migración de las células epiteliales de la superficie celómica de la cresta gonadal. Este primordio se mantiene en estado indiferenciado hasta la séptima semana. Durante el estado indiferenciado, en ambos sexos, prolifera el epitelio de la cresta genital que rodea a las células germinales, lo que formará los cordones sexuales en ambos sexos (Park, 2005).

La gónada indiferenciada está formada por dos linajes celulares, las células germinales y las células somáticas (McLaren, 2000). Las células precursoras de las células germinales son llamadas células germinales primordiales (CGP) y son de origen extragonadal (Merchant y Moreno, 1998). Las CGP del ratón derivan del ectodermo embrionario y se han detectado en el endodermo del saco vitelino y el mesodermo del alantoides, las cuales, entre los 10 y 12 días migran a través del intestino posterior y del mesenterio dorsal hasta colonizar las crestas genitales (figura 1) (Ginsburg et al, 1990). Se ha descrito que las CGP son guiadas hacia la cresta gonadal por proteínas de la matriz extracelular expresadas a lo largo del mesenterio dorsal y del intestino posterior y pueden ser distinguidas por la expresión de marcadores de células madre como la fosfatasa alcalina placentaria (FA), OCT3/4 y c-Kit. Durante este proceso las CGP muestran una activa proliferación mitótica duplicando su número en el trayecto hacia la cresta gonadal (Wylie, 1999; Bendel, 1998).

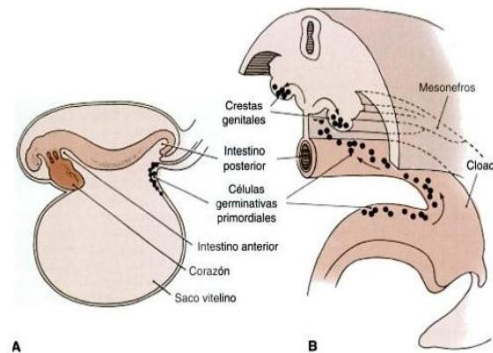


Figura 1: A) Esquema que muestra el sitio de origen de las CGP en la pared del saco vitelino en un embrión de 3 semanas. B) Vía migratoria de las CGP a lo largo de la pared del saco vitelino y mesenterio dorsal dentro de las crestas genitales en desarrollo (Modificado de Campbell et al, 2009).

En los embriones XY, los cordones sexuales de la gónada indiferenciada proliferan hasta la octava semana. Posteriormente los cordones sexuales, ahora llamados cordones testiculares, pierden contacto con la superficie del epitelio celómico y comienzan a separarse debido a una reorganización del tejido conectivo característico del testículo en la que se observa la migración de células mioides y endoteliales desde el mesonefros hacia la gónada, lo que formará la túnica albugínea (figura 2) (Martineau et al, 1997; Capel et al, 1999; Tilmann et al, 1999). Las células de tipo epitelial que conforman los cordones testiculares se denominan células pre-Sertoli, y cuando estas células empiezan a producir y secretar la hormona o sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS por sus siglas en inglés), se definen como células de Sertoli. Seguido de los cambios morfológicos, las células de Sertoli constituyen una fuente parácrina temprana de factores de crecimiento y diferenciación de otras células del testículo como las células de Leydig. La producción de MIS es el primer producto hormonal del testículo fetal y es necesaria en la regresión de los conductos Müllerianos, primordio de los genitales internos femeninos (Petersen y Söder, 2006).

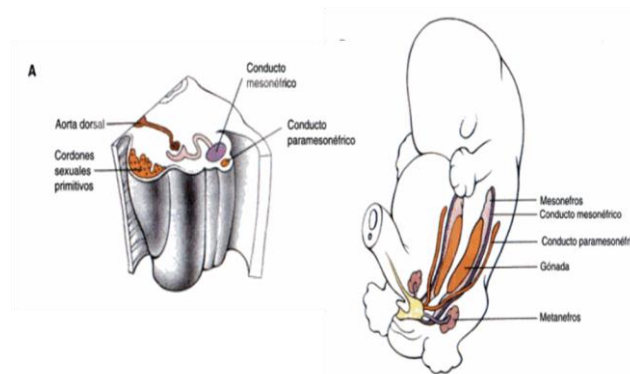


Figura 2: Esquema que muestra la formación de las crestas genitales y conductos paramesonéfricos. A) durante la 5ª y 6ª semanas se forman las crestas genitales en la pared abdominal posterior en la parte media del mesonéfricos en desarrollo. B) durante la 6ª semana, los conductos paramesonéfricos se desarrollan a los lados del mesonéfricos (Modificado de Campbell et al, 2009).

Otro de los componentes somáticos son las células esteroideogénicas. En el macho estas células migran del epitelio celómico y del mesénquima del mesonéfricos del estroma gonadal y se diferencian en células de Leydig (Morohashi 1997; Merchant y Moreno, 1998), que sintetizan y secretan testosterona, hormona esencial en la masculinización del feto. La diferenciación de la gónada, que inicia en la séptima semana del desarrollo fetal en el humano, depende de las señales provenientes de las células de Sertoli. El factor de crecimiento de fibroblastos-9 y la molécula de señalización Desert Hedgehog (DHH) son factores derivados de las células de Sertoli y son requeridos en la diferenciación y funcionamiento de las células de Leydig (Clark, 2007; Colvin et al, 2001; O'Shaughnessy et al, 1998). Las células de Leydig fetales en el humano son las primeras en aparecer una vez formado el testículo e inician la producción de andrógenos en la octava semana de gestación (O'Shaughnessy et al, 2007). Estas células se localizan en el tejido intersticial del testículo, son productoras del Factor esteroideogénico 1 (SF1, por sus siglas en inglés) (requerido en la esteroideogénesis) y del factor asociado a la insulina-3 (INSL3 por sus siglas en inglés) un factor necesario en el descenso testicular (Ivell y Hartung, 2003; Ferlin et al, 2006).



El tejido conectivo o células del estroma son importantes constituyentes del testículo y son necesarios en la histogénesis de los cordones seminíferos. Estas células son conocidas como peritubulares o células mioides y forman una capa basal alrededor de los cordones seminíferos, al mismo tiempo que dan soporte a las células de Sertoli (Jeanes et al, 2005). Las células que dan origen a las células mioides migran directamente del mesonéfros adyacente hacia las células de Sertoli por quimiotaxis, contribuyen a la vascularización del testículo y su migración es dependiente de la expresión de los genes *SOX9* y *SRY* en las células de Sertoli. Durante la vida fetal y la niñez, las células germinales se desarrollan en pro-espermatogonias y se mantienen en reposo, mientras que los cordones testiculares se mantienen sólidos. En la pubertad, sin embargo, los cordones se abirán y formarán los tubos seminíferos (Capel et al, 1999, Schmahl y Capel et al, 2000).

La diferenciación de los genitales internos y externos que continua después del establecimiento de la gónada masculina depende de la integridad funcional del testículo fetal. Los principales aspectos de este proceso involucran el desarrollo de los componentes que permitan el transporte, la maduración, el almacenamiento y la liberación de los gametos masculinos (Gassei y Schlatt, 2007).

B) Diferenciación fenotípica

La gónada indiferenciada tanto de individuos XX y XY, está acompañada de dos pares de conductos sexuales: los conductos paramesonéfricos o conductos de Müller que se diferencian en los genitales internos de la hembra y los conductos mesonéfricos o conductos de Wolff, los cuales dan origen a los genitales internos del macho. En el humano, los conductos de Wolff se desarrollan alrededor del día 24 de gestación, surgen a partir del mesénquima paravertebral como cordones sólidos de células que circulan por el interior del mesonéfros y que posteriormente abren hacia la cloaca, donde sirven como el

principal conducto excretor del embrión (Wilson et al, 1981; Lawrence et al, 1992).

Los conductos de Müller se encuentran externos al mesonéfros y siguen un recorrido paralelo al de los conductos de Wolff, luego los cruzan hasta unirse ambos conductos Müllerianos (Wilson et al, 1981). Estos conductos surgen por invaginación de la superficie del epitelio celómico lateral (Didier, 1971; Paranko et al, 1985; 1986). En el embrión sexualmente indiferenciado existe una apertura para los conductos genitales y el tracto urinario hacia el exterior del embrión, denominado seno urogenital. El desarrollo y destino de los conductos genitales así como del seno urogenital dependen del tipo de gónada que se desarrolle. En el macho, los conductos de Wolff persisten mientras que los de Müller degeneran. La parte craneal de cada conducto de Wolff origina el epidídimo, la parte media origina el conducto deferente y la parte caudal forma el conducto eyaculador y la vesícula seminal (figura 3) (Wilson et al, 1981).

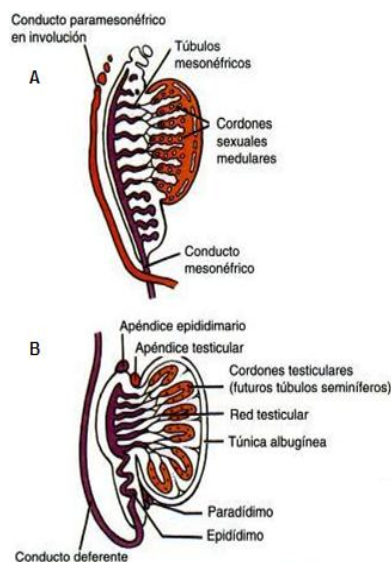


Figura 3: Esquema que muestra el desarrollo del testículo A) se observa la involución del conducto paramesonérfico o conducto de Müller y el desarrollo del conducto mesonérfico o de Wolff B) se observan las estructuras derivadas de los conductos de Wolff y otras que conforman al testículo (Modificado de Campbell et al, 2009).

1.3 MECANISMO DE DESCENSO TESTICULAR

El desarrollo de una adecuada espermatogénesis a futuro, los testículos deben ubicarse en el escroto, al exterior del cuerpo, en un ambiente de menor temperatura corporal. Para adquirir esta posición los testículos deben llevar a cabo el descenso testicular. La regulación de este proceso en humanos es compleja e intervienen factores genéticos, hormonales, físicos y ambientales (Virtanen, et al, 2007), lo que depende del desarrollo de varias estructuras como el gubernáculo, el proceso vaginal, el canal inguinal, los vasos espermáticos y el escroto (Hotson et al, 1997).

El descenso de los testículos se presenta en dos etapas, la transabdominal y la inguinoescrotal. En el humano la primera etapa ocurre en la semana 12 de la gestación y la segunda etapa ocurre entre la semana 26 a la 32 (figura 4) (Hutson y Donahue, 1986).

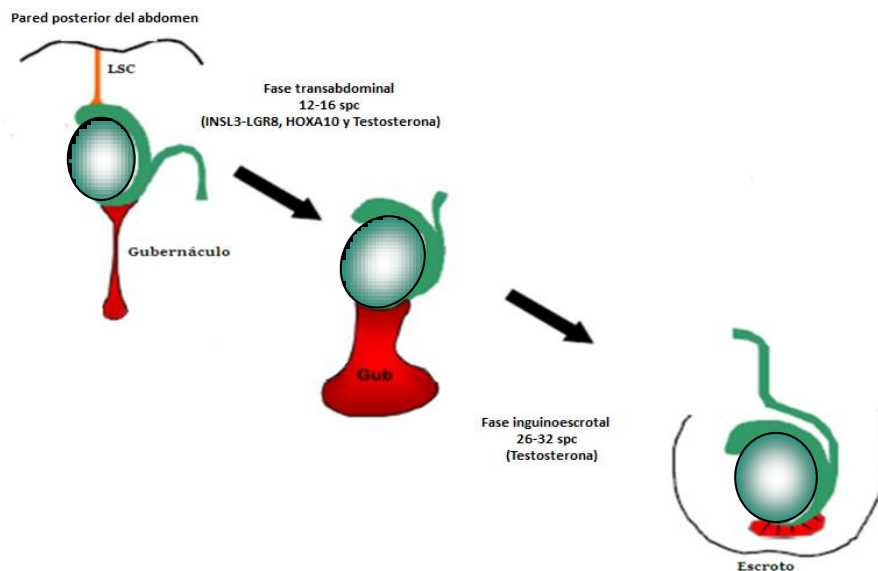


Figura 4: Esquema que muestra las fases del descenso testicular (Modificado de Klonish et al, 2004).



Durante la semana 12 a la 16 de gestación se presenta la primera etapa del descenso testicular, en la cual el testículo se localiza en el abdomen para posteriormente desplazarse hacia el escroto. En posición abdominal, el testículo está suspendido por dos ligamentos; uno que lo une al riñón, llamado ligamento suspensor craneal (LSC) y otro que conecta al testículo y el epidídimo al piso del escroto, conocido como gubernáculo (Klonish et al, 2004).

La fase transabdominal se caracteriza por el crecimiento del gubernáculo, debido tanto a la proliferación de sus células, como a la síntesis de glicosaminoglicanos y ácido hialurónico. Estos procesos dilatan el canal inguinal y el escroto facilitando el paso del testículo por estas estructuras. En esta fase del descenso también participan la MIS y el INSL3. Se ha demostrado que el INSL3 actúa directamente sobre el gubernáculo a través de su receptor asociado con la relaxina (RXFP2), también conocido como LGR8 o GREAT (Overbeek et al, 2001 y Kumagai et al, 2002).

Los estudios en animales de laboratorio han demostrado el papel del INSL3 en la primera fase del descenso, ya que al generar un ratón *knock-out* de INSL3 se produce criptorquidia bilateral aislada a causa de la presencia de anomalías en el desarrollo del gubernáculo, sin ninguna reacción sobre el crecimiento (Nef y Parada, 1999; Zimmermann et al, 1999). Esto sugiere que el INSL3 es el factor que causa la dilatación del gubernáculo, permitiendo el descenso testicular adecuado (Hutson y Hasthorpe, 2005).

También se ha sugerido a la MIS, como responsable de la etapa del descenso transabdominal (Hutson, 1985). Debido a que las mutaciones en el receptor para la MIS causan persistencia de los conductos de Müller en el macho, interrumpiendo, mecánicamente, el descenso de los testículos y provocando feminización del gubernáculo. Sin embargo, existe evidencia de que ratones deficientes del receptor de MIS no sólo tienen descenso testicular normal, sino que también esta hormona tiene un efecto indirecto sobre el crecimiento del gubernáculo, por lo que su participación en el descenso



testicular aún es controversial (Ivell y Hartung, 2003; Hutson y Hasthorpe, 2005; Virtanen y Toppari, 2008; Foresta et al, 2008 y Acerini, 2008).

Durante el descenso inguinoescrotal del testículo, se lleva a cabo la regresión del gubernáculo quedando solo como un tejido fibroso que mantiene anclado el testículo al escroto. Esta fase del descenso está bajo control de la testosterona y la presión abdominal (Hutson et al, 1997). Debido al efecto de la testosterona el LSC involuciona permitiendo que el testículo permanezca muy cercano al anillo inguinal interno, y esto cause la migración del testículo hacia la región inguinal (Costa et al, 2002; Hutson y Hasthrope, 2005; Foresta et al, 2008).

El efecto de la testosterona durante el descenso inguinoescrotal puede ocurrir directamente a través de los receptores de andrógenos, que en humanos se expresan en el gubernáculo (Hosie et al, 1999, Viguera et al., 2004), y que se propone participan en la regresión gubernacular (Barthold et al, 2000).

Los estudios con roedores sugieren una acción indirecta de la testosterona a través del Nervio Genitofemoral (NGF) que, en respuesta a la testosterona, libera el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP por sus siglas en inglés), induciendo la contracción de la musculatura del gubernáculo y de esta forma desplaza al testículo hacia el escroto (Yong et al, 2008, Viguera et al, 2003).

Cuando el o los testículos no descienden es una condición patológica denominada criptorquidia (Chavarría, 2011).



1.4 DIFERENCIACIÓN, MADURACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TESTICULARES POSTNATALES.

Durante la etapa postnatal temprana se llevan a cabo procesos importantes para el establecimiento de la fertilidad futura. Estos consisten en la proliferación de las células de Sertoli diferenciación de las células de Leydig a partir de células mesenquimatosas y de los gonocitos a espermatogonias.

1.4.1 CÉLULAS DE SERTOLI

La proliferación de las células de Sertoli es un proceso crucial ya que existe una estrecha relación entre el número de espermatozoides producidos en la edad adulta con el número de células de Sertoli en los testículos. Se sabe que cada célula de Sertoli soporta un número determinado de células germinales (Orth et al, 1988; Sharpe et al, 2003).

Sólo las células de Sertoli inmaduras proliferan, por lo que el número final de células de Sertoli se determina antes de la edad adulta. Además las células de Sertoli proliferan durante tres períodos de la vida, en la fetal, la neonatal y en el período peripuberal en todas las especies de mamíferos (Plant y Marshall, 2001) aunque el período fetal es el de mayor actividad proliferativa (De Franca et al, 2000).

En torno a la pubertad, las células de Sertoli presentan un cambio radical en su morfología y función, anunciando el inicio de un estado inmaduro, proliferativo a un estado maduro, no proliferativo. El núcleo se agranda y se convierte en tripartito y el nucléolo se hace más prominente. Las células de Sertoli adyacentes forman uniones estrechas entre sí para crear un compartimiento único adluminal en el que los pasos meiótico y post-meiótico de la espermatogénesis pueden proceder, además de permitir la formación de una luz (Jégou, 1992; McLaren et al, 1993; Sharpe, 1994).



Entre los factores que participan en la maduración de las células de Sertoli, la hormona tiroidea (T3) juega un papel importante en su maduración, aunque otros factores pueden estar involucrados (Means et al, 1976). Con el uso de modelos animales de laboratorio se ha mostrado que la T3 conjuntamente con los andrógenos y la Hormona Folículo Estimulante (FSH por sus siglas en inglés) participan en la maduración de las células de Sertoli. Además es probable que las células germinales participen en la maduración de estas células (Arambepola et al, 1998).

La expresión de receptores para andrógenos (AR) en las células de Sertoli en los seres humanos, es probablemente, un evento tardío en la pubertad (Waring et al, 2000). El aumento de las concentraciones de FSH y testosterona en la pubertad, coincide con la expresión de AR en las células de Sertoli, lo que podría permitir su maduración final (Sharpe et al, 2003).

Se pueden presentar algunos cambios en la función secretora de las células de Sertoli debido a la ausencia de células germinales (J'egou y Sharpe, 1993; Sharpe et al, 1993; Boujrad et al, 1995; Guitton et al, 2000). La ausencia de células germinales pueden dar lugar a la des-diferenciación de las células de Sertoli, de tal manera que las funciones de las células de Sertoli inmaduras son funcionalmente conectadas de nuevo. Sin embargo, es importante reconocer que la ausencia de células germinales puede ser un reflejo de anomalías subyacentes en las células de Sertoli, como la falta de su maduración (Steger et al, 1996; Maymon et al, 2002).

El gen para MIS es uno de los primeros que se activan en las células de Sertoli, después de su diferenciación, durante la vida fetal (Josso et al, 2001), y se expresa, mientras éstas permanezcan inmaduras. En la pubertad, la expresión de MIS en las células de Sertoli y su secreción en el torrente sanguíneo es regulada a la baja, lo que coincide con la aparición de las células germinales meióticas, la presencia de receptores para andrógenos y la maduración de las células de Sertoli (Rey et al, 1994, 1999; Rajpert et al,



1999). La persistencia de una elevada expresión de MIS en las células de Sertoli o altas concentraciones en la sangre, en la edad adulta, puede indicar una falta de maduración de las células de Sertoli, aunque también puede reflejar deficiencias en la acción de los andrógenos (Sharpe et al, 2003).

La enzima p450 cataliza la conversión de la testosterona a estradiol y en el varón esta enzima se inhibe, cambio que favorece la producción de testosterona, la p450 se expresa en las células de Sertoli fetales o neonatales, pero la expresión es regulada a la baja durante la maduración de dichas células (Palmero et al, 1995; Panno et al, 1995), de tal manera que en los testículos de ratas adultas, la p450 se expresa principalmente en las células de Leydig y en algunas células germinales (Carreau et al, 1999; Turner et al, 2002).

La molécula de adhesión neuronal (NCAM por sus siglas en inglés) se expresa en las células de Sertoli fetales o inmaduras y es importantes en la adhesión del gonocito o pre-espermatogonia durante su migración intratubular a la membrana basal (Laslett et al, 2000; Orth et al, 2000). En ratones, la expresión de NCAM se inhibe durante la maduración de las células de Sertoli (Orth y Jester, 1995; Orth et al, 2000) y también NCAM puede ser regulada a la baja experimentalmente mediante la administración de T3 en ratones (Laslett et al, 2000).

1.4.2 CÉLULAS DE LEYDIG

La población de células de Leydig que se diferencia prenatal y postnatalmente se identifican como células de Leydig fetales y adultas, respectivamente. En la rata se han documentado la presencia de estas dos poblaciones distintas de células de Leydig desde 1959 (Roosen y Anderson, 1959). Durante mucho tiempo se ha sugerido que las células mesenquimatosas en el intersticio testicular son las células precursoras de las células de Leydig de los testículos de mamíferos, incluyendo la rata (Lording y Kretser, 1972; Niemi y Kormano,



1964), el ratón (Baillie, 1964), el cerdo (Dierichs et al, 1973), el hurón (Deansley, 1977), y el humano (Mancini et al, 1963).

Las células mesenquimatosas del intersticio testicular se originan de los tubos mesonéfricos o tejido conectivo de la gónada en desarrollo procedentes del mesodermo embrionario. Aunque algunas de las células mesenquimatosas en el intersticio testicular se diferencian en células de Leydig fetales y muchos otros tipos de células intersticiales, las demás conservan sus características indiferenciadas y sirven como células madre de las células adultas de Leydig en los testículos después del parto (Byscove, 1986).

Las células madre mesenquimatosas se observan en unas posiciones centrales o distribuidas al azar en el intersticio. Los primeros informes (Lording y Kretser, 1972; Russell et al, 1995; Haider et al, 1995, Chemes, 1996) apoyan la opinión de células mesenquimatosas peritubulares como las precursoras principales de las células de Leydig adultas (Mendis y Siril, 2001).

El primer paso en el proceso de diferenciación de las células de Leydig postnatales adultas, es la transformación de las células mesenquimatosas en células progenitoras. Las células progenitoras son morfológicamente idénticas a las células mesenquimatosas, pero son claramente reconocibles por que producen enzimas esteroideogénicas y son capaces de producir andrógenos. Cuando las células mesenquimatosas se diferencian en células progenitoras, debido a la biosíntesis de hormonas esteroideas, adquieren enzimas como la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (3β -HSD), el citocromo p450sec y p450c17, antes de que se expresen los receptores para LH en la célula (Haider et al, 1986; Hardy et al, 1990; Haider y Servos, 1998; Ariyaratne et al, 2000). Las células progenitoras tienen receptores para la LH (Clausen et al, 1981; Huhtaniemi et al, 1986; Shan y Hardy, 1992; Risbridger y Davies, 1994), y esto ha sido confirmado en estudios anteriores (figura 5) (Ariyaratne et al, 2000).

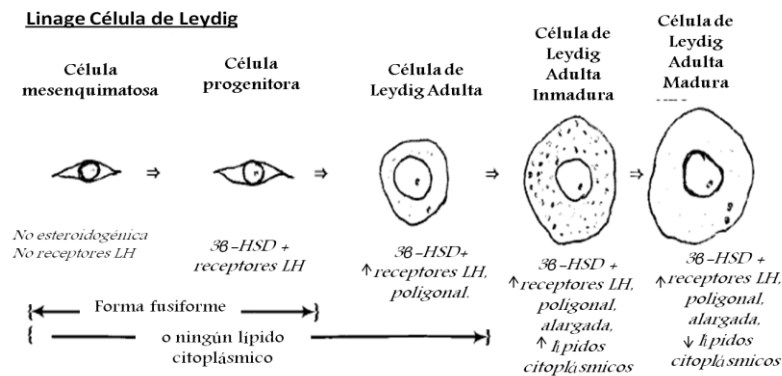


Figura 5: Linaje de las células de Leydig, en donde se observa los cambios durante el desarrollo de dichas células a partir de células mesenquimatosas hasta células Leydig adultas maduras. (CLA) así como la expresión de receptores y enzimas esteroideogénicas durante su desarrollo (Mendis y Siril, 2001).

En la rata prepúber, el inicio de la diferenciación de las células mesenquimatosas en el testículo es independiente de la LH, como ocurre en la etapa fetal de la rata y el ratón (Majdic et al, 1988 y O'Shaughnessy et al, 1998).

Durante la séptima semana de edad en el humano, comienza la diferenciación de las células de Leydig. Este evento y la proliferación de dichas células son influenciados por factores producidos por las células de Sertoli (Clark et al, 2000; Colvin et al, 2001).

El siguiente paso es la transformación de las células progenitoras en células de Leydig adultas. La diferencia más marcada entre estas células es el cambio de forma, debido a que pasan de una forma alargada a poligonal. Esta diferenciación se acompaña por movimientos en dirección al centro del intersticio, además, éstas son más pequeñas que las células de Leydig adultas inmaduras y maduras. Las nuevas células Leydig formadas no contienen deshidrogenasa 1 (11β-HSD1), cuando las células de Leydig adultas se acaban de diferenciar tan solo secretan el 40% de testosterona en comparación con las que ya están bien diferenciadas. En comparación con las células maduras e



inmaduras, las células Leydig adultas cuentan con una gran capacidad de secretar androstenediona durante la etapa postnatal (Mendis y Siril, 2001; Chen et al, 2009).

El tamaño de las nuevas células de Leydig adultas inmaduras se incrementa y adquiere gotas lipídicas. El número y tamaño de gotas de lípidos en las células de Leydig adultas inmaduras post-natales parecen ser más pequeñas que en las células de Leydig adultas inmaduras fetales (Mendis y Siril, 2001; Chen et al, 2009). Estas células son las dominantes del linaje de las células Leydig de la etapa postnatal. Son positivas para la enzima 11β -HSD1. Sin embargo la actividad de la 17β -HSD, permanece baja en etapa postnatal, como resultado, la habilidad de las células de Leydig adultas inmaduras de producir testosterona es más baja en comparación con las células de Leydig adultas maduras (Mendis y Siril, 2001; Chen et al, 2009).

El último paso es el surgimiento de las células de Leydig adultas maduras. Esta transición se caracteriza por el aumento significativo en el tamaño promedio de las células (Ariyaratne y Mendis, 2000) y la desaparición de las gotas de lípidos en el citoplasma (Mendis et al, 1987; Russell et al, 1995; Zirkin y Ewind, 1987). Además se incrementa la secreción de testosterona en respuesta a la acción de la LH circulante, esto es debido a la expresión de un mayor número de receptores de LH. (Shan y Hardy, 1992).

Con el incremento en el volumen de los organelos tales como retículo endoplásmico liso, la actividad esteroideogénica de las células se incrementa, particularmente 17β -HSD, que catalizan el último paso de la síntesis de testosterona (Fig. 5) (Mendis y Siril, 2001; Chen et al, 2009).

Los mecanismos celulares que dan lugar a la diferenciación de la población adulta de las células de Leydig siguen funcionando en el testículo maduro para mantener un número constante de células de Leydig. Aunque los mecanismos implicados en el mantenimiento de esta población en los



testículos adultos aún no están bien establecidos, se propone que las células de Leydig muertas por apoptosis son remplazadas por nuevas células de Leydig (Teerds, 1996). Se ha demostrado que las hormonas esteroideogénicas circulantes, así como los factores de crecimiento tienen efectos importantes en cada etapa de desarrollo de la diferenciación y maduración de la población de células de Leydig adultas (Mendis y Siril, 2001).

1.4.3 GONOCITOS

Los gonocitos testiculares son los precursores fetal/neonatal, de las espermatogonias indiferenciadas. El término gonocito fue propuesto originalmente por Clermont y Perey (1957) para designar a las células germinales primordiales (CGP) después de que pasan a ser residentes en la gónada en desarrollo (Culty, 2009). Los gonocitos testiculares también se identifican como pre-espermatogonias, pro-espermatogonias o, más ampliamente, como células germinales primitivas, aunque el término gonocito ha sido el más empleado (Gaskell et al, 2004).

El desarrollo de las células germinales se compone de dos fases principales que conducen al desarrollo de la espermatogonia y posteriormente a la formación de los espermatozoides. La primera fase abarca el período fetal y neonatal, que conduce a la formación de espermatogonias. Este período de desarrollo incluye dos tipos principales de células germinales: las CGP y el gonocito. Ambas presentan una morfología similar, ya que son células grandes, circulares con un núcleo prominente que contiene uno o dos nucléolos (Baillie, 1964), además de presentar un citoplasma en forma de anillo que rodea al núcleo de estas células (Culty, 2009).

Los gonocitos neonatales se encuentran acoplados a las células de Sertoli, vía uniones tipo *gap*, y dependen de factores producidos por las células de Sertoli, para su diferenciación, tales como: las NCAM, el factor de células *stem* (SCF por sus siglas en inglés) y su receptor, el c-Kit, caderinas de hipófisis y cerebro de tipo corto (STPB-C por sus siglas en inglés) y el factor de



crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) que se describirán a continuación. Muchos de estos factores han sido propuestos, por estudios en animales de laboratorio como la rata y el ratón (Tabla I). El momento en el cual se diferencian los gonocitos, varía con la especie, en el humano se inicia en el último tercio de la gestación y se concluye durante el segundo al cuarto mes de edad (Paniagua y Nistal, 1984; Brinster, 2002; Wu et al, 2009).

a) NCAM

El NCAM es una glicoproteína de superficie que mantiene la adhesión entre las células de Sertoli y los gonocitos (Wu et al, 2003). Comprende tres isoformas con masa molecular distinta de 120, 140 y 180 Kda. La de 140 Kda se encuentra en la superficie celular y se sabe que es necesaria en la adhesión, división, diferenciación y migración de distintos tipos celulares (Edelman y Crossin, 1991; Seki y Arai, 1993; Cunningham, 1995; Ling et al, 1998).

b) SCF

El SCF se expresa en el tejido somático del embrión de ratón, a lo largo de la vía de migración de las CGP, con alto nivel de expresión en la cresta genital (Keshet et al, 1991; Matsui et al, 1991). Los estudios experimentales han reportado que la mutación del SCF o su receptor, resulta en un número reducido de CGP (Brannan et al, 1992; McCoshen y McCallion, 1975; Buehr et al., 1993), además de que la interacción SCF-c-Kit incrementa la proliferación y suprime la apoptosis de las CGP, tal como la diferenciación a espermatogonias (Godin et al, 1991; Dolci et al, 1991; Pesce et al, 1993; 2001; Yan et al, 2000). Cuando las CGP migran a la gónada y se diferencian a gonocitos, las células de Sertoli secretan SCF y pueden mantener la supervivencia y la actividad mitótica de los gonocitos humanos (Strohmeyer et al, 1995).



c) c-Kit

El c-Kit es un factor importante para la migración de las CGP, la expresión de éste fue descrita por primera vez en un tumor de células germinales por Strohmeyer et al, (1995) y en el carcinoma *in situ* testicular (CISt por sus siglas en inglés) por Rajpert y Skakkebaek (1993); Strohmeyer et al, (1995) y Bokemeyer et al, (1996). La expresión es gradualmente reducida con la edad y puede mantener la sobrevivencia de células indiferenciadas. Se ha propuesto que la expresión de c-Kit puede contribuir al desarrollo neoplásico al prolongar la sobrevivencia de células pluripotenciales (Stoop et al, 2008).

Es una proteína que actúa como un sistema de señalización esencial para la sobrevivencia, migración y diferenciación de células germinales tempranas (Dolci et al, 1991, 2001; Godin et al, 1991; Pesce et al, 1993; Yan et al, 2000). Se expresa fuertemente en gonocitos de humano y rata en etapas fetales e infantiles (Jørgensen et al, 1995; Robinson et al, 2001; Gaskell et al, 2004; Honecker et al, 2004) y muy poco o indetectable en espermatogonias del testículo humano adulto (Rajpert et al, 2003b).

d) STPB-C

Estudios *in vivo* e *in vitro*, empleando técnicas de *Northern*, e hibridación *in situ*, han reportado una alta expresión de proteínas STPB-C, en el testículo de neonatos y esta expresión disminuye durante el desarrollo. Por su localización se sugiere que actúan en las adhesiones entre las células de Sertoli y los gonocitos, manteniendo la sobrevivencia y desarrollo de estas células germinales (Wu et al, 2003).

e) PDGF

El PDGF es una proteína que regula la proliferación (Gnessi et al, 1995; Li et al, 1997; Thuillier et al, 2003), migración y diferenciación celular (Basciani et al,



2008). Las células de Sertoli postnatales tempranas producen este factor. El gonocito presenta receptores para esta proteína y responde proliferando mitóticamente y migrando del centro del cordón a la periferia, lo que genera que se diferencie en espermatogonia (Basciani et al, 2008).

Por otro lado, otros factores que también se expresan durante el desarrollo en los gonocitos son el OCT3/4, AP-2 γ , NANOG, fosfatasa alcalina placentaria (FA) y c-Kit, los cuales abundan durante la etapa fetal temprana manteniendo a los gonocitos como pluripotentes e indiferenciados y su expresión disminuye gradualmente mientras los gonocitos se diferencian a espermatogonias inmaduras (Jorgensen et al, 1995; Gaskell et al, 2004; Hoei-Hansen et al, 2004b, 2005; Honecker et al, 2004; Rajpert et al, 2004, 2006). La diferenciación de los gonocitos a espermatogonias, en diversas especies, incluyendo el humano, se asocia con la reducción gradual de estos marcadores y la expresión de una proteína celular específica denominada VASA (Mitchell et al, 2008). A continuación se describen los factores de pluripotencialidad.

f) OCT3/4

El OCT3/4, también conocido como *otf3* o *pou5f1*, es un miembro de la familia de factores de transcripción POU. Algunos sitios de unión a POU5F han sido identificados en varios genes, incluyendo el factor de crecimiento fibroblástico 4 y el receptor promotor alternativo del factor de crecimiento derivado de plaquetas α (Kraft et al, 1996). Los datos indican que *pou5f1*/POU5F1 funciona como un interruptor maestro en la diferenciación mediante la regulación de las células que tienen, o pueden desarrollar pluripotencialidad (Looijenga et al, 2003).

Empleando técnicas de inmunohistoquímica, se ha analizado la presencia de POU5F1 en algunos tumores testiculares de células germinales (TGCT por sus siglas en inglés). La proteína OCT3/4 se ha detectado consistentemente en el carcinoma *in situ*, gonadoblastoma, seminomas,



germinoma, disgerminoma, y carcinoma embrionario, pero no en los diversos tipos de no seminomas diferenciados (Looijenga et al, 2003).

El gen OCT3/4 codifica para un factor de transcripción el cual se encuentra involucrado en el establecimiento de la línea germinal en mamíferos. La expresión de OCT3/4 regula la pluripotencialidad, diferenciación de las células madre embrionarias y es necesaria para la sobrevivencia y migración de las células germinales primordiales (Yeom et al, 1996). También se ha comprobado que la expresión de OCT3/4 disminuye durante la maduración de las gónadas masculina y femenina (Honecker et al, 2004; Stoop et al, 2005). Esto proporciona el primer marcador para identificar células pluripotenciales en el embrión. En el CIST, la proteína OCT3/4 se encuentra en células germinales localizadas en la lámina basal y en el centro de tubos seminíferos y de bajo de las uniones estrechas entre las células de Sertoli (Martin, 1981). En consecuencia, la expresión de OCT3/4 después de los 4 meses de edad, se considera el principal factor de riesgo para la transformación maligna de las células germinales primordiales (Looijenga et al, 2003).

g) AP2 γ

El factor de transcripción activador de la proteína 2 (AP2 γ) es una proteína involucrada en la sobrevivencia de las células germinales inmaduras (Hoei-Hansen et al, 2004b; Almstrup et al, 2004). Se expresa en gonocitos y células germinales neoplásicas, incluyendo células del CIST (Rajpert, 2006).

Pauls et al, (2005), mediante estudios en testículos humanos fetales demostró que el AP-2 γ se expresa desde la semana 12 a la 37 de la gestación en gonocitos fetales con los niveles más altos de expresión entre la semana 12 y 20, incluidos los períodos de gonocitos mitóticos y migratorios, posteriormente su expresión disminuye progresivamente y no se observa en la semana 40 (recién nacidos). Estos cambios son paralelos con cambios similares en la expresión de c-Kit, por lo que propusieron que el AP-2 γ regula la



expresión de c-Kit en gonocitos fetales humanos (Yamamoto et al, 1993; Yasuda et al, 1993).

En un estudio reciente que compara la diferenciación de células germinales entre primates y los seres humanos, Mitchell et al (2008) obtuvieron resultados similares a los de Pauls et al, (2005, 2006) demostrando que el AP-2 γ se co-expresa con OCT3/4 y NANOG en gonocitos fetales y disminuye progresivamente hasta su totalidad, después de 6 meses y 6 semanas de edad en humanos y primates, respectivamente.

La mayoría de los estudios de AP-2 γ y NANOG se relacionan con su uso como marcador de tumor de células germinales, apoyando la hipótesis del origen del CIST y TGCT a partir de los gonocitos, (Hoei-Hansen et al, 2004; Pauls et al, 2005; Biermann et al, 2006). Por lo tanto, la expresión de AP-2 γ se ha confirmado en gonocitos de primates, abarcando etapas mitóticas, migratorias, y quiescentes de células germinales, pero queda por confirmar en gonocitos de roedores (Culty, 2009).

h) NANOG

El NANOG se expresa y es activo en CGP además de ser un marcador de tumores testiculares de células germinales en humanos (Rajpert, 2006). En el tejido testicular humano NANOG está presente en PGC y en gonocitos fetales hasta la semana 20 de gestación, el último período que corresponde a una etapa de gonocitos mitóticos. Posteriormente, la expresión de NANOG se conserva sólo en un pequeño grupo de gonocitos hasta los 3 meses después del nacimiento, momento en el que la mayoría de las células germinales se encuentran quiescentes, y está ausente en los testículos de niños y adultos (Hoei-Hansen et al, 2005; Rajpert, 2006).

La mayoría de los estudios en testículo se han enfocado en la expresión y función de NANOG en PGCs, y en su uso potencial como marcador de



tumores testiculares de células germinales en humanos (Rajpert, 2006 y Yamaguchi et al, 2005), su expresión disminuye a medida que las PGCs se convierten en residentes en la formación de los testículos, cuando los gonocitos son quiescentes. Varios estudios examinaron la expresión de NANOG en testículo fetal humano en comparación con CIST y TGCT en busca de genes que podrían proporcionar indicios sobre el origen de estas patologías (Hoei-Hansen et al, 2005; Kerr et al, 2008; Rajpert, 2006). Estos estudios indicaron que NANOG está presente en PGCs humanas y en gonocitos fetales hasta la semana 20 de gestación, el último período que corresponde a una etapa de gonocitos mitóticos. Posteriormente, la expresión NANOG se conserva sólo en un pequeño grupo de gonocitos hasta los 3 meses después del nacimiento, momento en el que la mayoría de las células germinales se encuentran quiescentes, y está ausente en los testículos de niños y adultos (Hoei-Hansen et al, 2005; Rajpert, 2006).

Sin embargo, un estudio realizado por Ezeh et al, (2005) informó de la detección de NANOG por inmunotinción positiva en espermatogonias de una sección de testículo normal, sugiriendo que la expresión NANOG podría ser retenida en un subconjunto de espermatogonias, de adultos (Culty, 2009).

i) FA

La FA es una enzima generada por las CGP, que permite su desplazamiento desde el alantoides hacia las crestas genitales. La presencia de esta enzima permite identificar este tipo celular, a los gonocitos y a células del CIST (Buehr et al, 1993). La FA es el marcador más utilizado en la práctica clínica (Vergouwen et al, 1991), aunque suele tener una función biológica desconocida en las células del CIST (Gaskell et al, 2004).

La FA tiene tres isoenzimas porque se origina en tres genes diferentes, una isoenzima de origen placentario, una intestinal y una que se llama no placentaria/no intestinal (Brandan et al, 2008). La FA sérica tiene varios



orígenes (hígado, riñón, placenta, intestino, huesos, leucocitos), aunque las fuentes más importantes son el hígado, los huesos y el intestino. Durante el crecimiento, los niveles séricos son altos debido al aumento de la fracción ósea, que traduce la actividad osteoblástica en el hueso. Lo mismo ocurre durante el embarazo, sobre todo en el tercer trimestre, en donde se detecta una elevación de FA de origen placentario (Brannan et al, 1992).

Aunque se sabe que los gonocitos son los precursores de las espermatogonias, estudios recientes basados en la expresión diferencial del factor de transcripción de neuroglia 3 (Ngn3 por sus siglas en inglés) en gonocitos y espermatogonias de ratón, han demostrado que no todos los gonocitos Ngn3⁻ se convierten en espermatogonias Ngn3⁺, y que una fracción de los gonocitos directamente se diferencian en espermatogonias Ngn3⁻, diferenciación de las espermatogonias que apoyará la primera fase de la espermatogénesis (Yoshida et al, 2006).

La segunda fase en el desarrollo de células germinales es el inicio del ciclo de la espermatogénesis, una sucesión regulada de eventos, que incluyen la división celular por mitosis y meiosis, y la diferenciación de procesos complejos, tales como la espermiogénesis, comenzando con la formación y diferenciación de espermatogonias y terminando con la producción de espermatozoides (Russell et al, 1990). En el humano se han descrito tres tipos de espermatogonias, la A-pálida, la A-oscura y la tipo B (Russell et al, 1990; Rooij, 2001). La espermatogonia tipo B y posteriores etapas de células germinales son visibles por primera vez de los 4 a 5 años de edad en humanos (Paniagua y Nistal, 1984) y pueden ser encontradas posteriormente durante toda la vida (Culty, 2009).

Se sugiere que los gonocitos de roedores y humanos comprenden diferentes etapas sucesivas de desarrollo, que se describen como etapa mitótica (M) y etapa de pro-espermatogonia de transición (T) que esta a su vez se subdivide en pro-espermatogonia T1 y T2 (Fukuda et al, 1975; Wartenberg,



1976; Hilscher, 1991; Vergouwen et al, 1991). Varios investigadores observaron que en humanos las pre/pro-espermatogonias M, T1 y T2 expresan diferentes niveles y combinaciones de genes (De Plaen et al, 1999; Aubry et al, 2001). De hecho, algunos estudios como el de Pagano et al (2000) basados en el índice mitótico, comportamiento migratorio y perfiles de genes han demostrado que las células germinales no están sincronizadas dentro de cada período de desarrollo, sino que hay una superposición de las subpoblaciones, que corresponde a la presencia de las células germinales quiescentes y células germinales mitóticas, así como células que se ubican tanto en la periferia y en el centro de los cordones (Culty, 2009).

En la figura 6 se ilustran las similitudes existentes entre las etapas sucesivas mitóticas y quiescentes o de reposo, de roedores y subpoblaciones de gonocitos humanos, que se extienden desde los 13 días post coito (dpc) a cinco días después del parto en roedores, y de 7 semanas de gestación a la semana 8 después del parto en humanos (Culty, 2009).

La identificación de genes relacionados con la troncalidad en las células embrionarias surgió en los años noventa, tras el establecimiento de líneas de células pluripotentes de embriones de ratón, donde se establecieron las condiciones necesarias para perpetuar y mantener estas células. (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981).

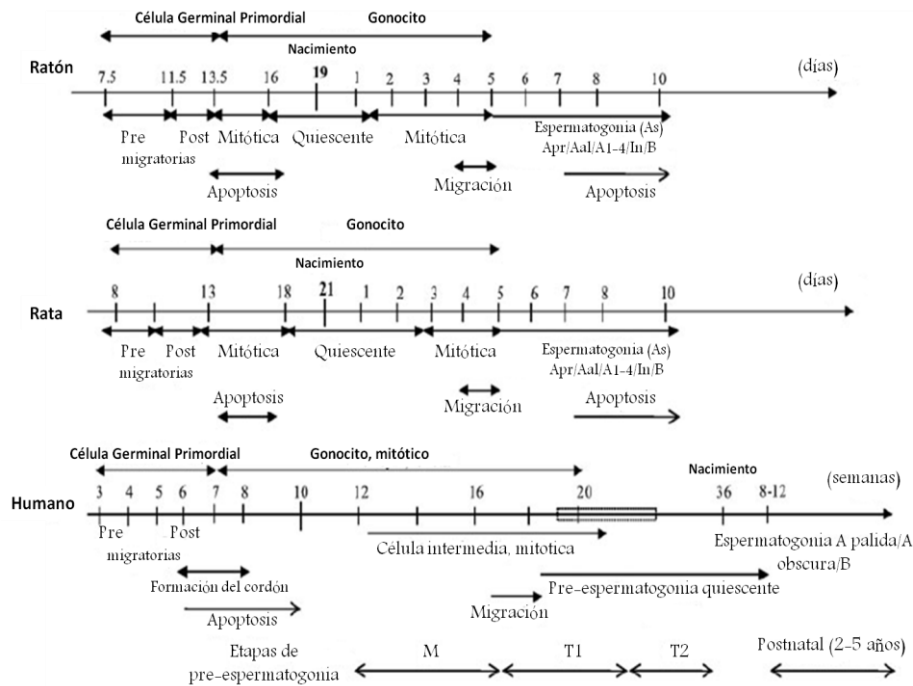


Figura 6. Representación esquemática de las líneas de tiempo para el desarrollo de los gonocitos en ratones, ratas y humanos. La caja en la línea del humano indica el período en que ocurre un cambio progresivo en la expresión de los genes OCT3/4 y MAGE-A4 durante las semanas 19 y 25 de la gestación (Culty, 2009).

La disponibilidad de las células *stem* embrionarias (CSE) y el carcinoma embrionario (CE) han permitido la determinación de los principales mecanismos moleculares y celulares que regulan el proceso de diferenciación de los gonocitos (Jakob, 1984; Rossant y Papaioannou, 1984). La posterior comparación de los perfiles de expresión genética entre estas líneas celulares llevó a la identificación de un grupo de genes considerados como marcadores de células madre embrionarias pluripotentes como son: Thy-1 (CD90), c-Kit (CD117) (Ling y Neben, 1997), podocalixina, una sialomucina relacionada con CD34 reconocidos por los anticuerpos TRA-1-60 y TRA-1-81 (Andrews et al, 1984; Schopperle y Dewolf, 2007) y los factores de transcripción OCT3/4, NANOG, SOX2, STELLAR, el TGF relacionado con el factor de crecimiento y el factor de diferenciación 3 (GDF3), y la proteína de unión RNA-DAZL, más identificada en células *stem* pluripotentes así como en CGP de mamíferos y/o



células tumorales germinales humanas (Nichols et al, 1998; Yen, 2004; Ezeh et al, 2005; Clark, 2007; Kerr et al, 2008). Oct4/3 se ha convertido en uno de los indicadores principales que se utilizan para identificar CGP y gonocitos (Zhao y Garbers, 2002).

Otro marcador de células pluripotentes que se estudia a menudo conjuntamente con OCT3/4 y/o NANOG es el factor de transcripción SOX2 que en ratones se ha demostrado se requiere para la formación de CSE. Sox2 también se ha descrito en CGP de ratón (Perret et al, 2008; Occidental et al, 2005).

STELLAR es uno de varios genes, junto con NANOG, GDF3, Ciclina D2 (CCND2), y K-Ras, ubicado en el cromosoma 12p, en el humano, un área implicada con el CIST y el TGCT a través de la amplificación genómica (Rajpert, 2006). El RNAm STELLAR está presente en la población de células germinales de testículos fetales (semanas de gestación 20-29), que corresponde a la etapa de prespermatogonias quiescentes (Culty, 2009).

Varios genes han sido identificados como marcadores de células germinales, incluyendo DAZL y VASA (Mvh en ratón), dos genes que interactúan con el RNA que es necesario para el desarrollo de células germinales en ratones machos, esto teniendo en cuenta la importante función desempeñada por el procesamiento del ARN durante la espermatogénesis (Foucault, 2002), se ha demostrado que DAZL se expresa desde CGP hasta etapas de espermatocitos tanto en ratones y humanos (Culty, 2009).

VASA es una proteína citosólica en humanos, se ha demostrado estar fuertemente expresada desde la fase migratoria de las CGP a etapas de espermatocitos, mientras que posteriormente sólo está presente en niveles bajos en espermátidas (Castrillón et al, 2000).



La supervivencia de gonocitos parece depender no sólo de factores parácrinos y autócrinos, sino también de la posición intra-tubular de las células en determinados períodos del desarrollo. El fracaso de la migración de gonocitos hacia la membrana basal se ha asociado con la inducción de la apoptosis (Sinha y Swerdloff, 1999; Tres y Kierszenbaum, 2005). Así, los factores a favor de la supervivencia son importantes pero no suficientes para asegurar al gonocito. Es posible que las células de Sertoli se programen a través de su propia secuencia de desarrollo a nivel local para secretar factores pro-apoptóticos después del quinto día post parto, y que el gonocito que logre reubicarse a la membrana basal escape de estas señales, o, alternativamente, durante su diferenciación en la membrana basal, los gonocitos podrían evolucionar para dejar de responder a las señales apoptóticas (Culty, 2009).

Entre los principales factores pro-apoptóticos en las células germinales están el TGF β s, que pertenecen a la superfamilia de citoquinas TGF β , que incluye las proteínas morfogenéticas óseas también, activinas, inhibinas y MIS (Loveland et al, 2007).

Una vez que se llevaron al cabo los procesos de diferenciación y proliferación de células testiculares postnatales el testículo entra en un periodo quiescente hasta que en la pubertad es activado bajo la participación de diferentes factores internos y externos, para dar inicio a la espermatogénesis.

Cuando el o los testículos no descienden adecuadamente se presenta la criptorquidia, dando como resultado células germinales indiferenciadas afectando el proceso normal de la espermatogénesis.

1.5 CRIPTORQUIDIA

El término criptorquidia se deriva de los vocablos griegos "*kryptos*" que significa oculto y "*orchis*" que significa testículo (Kurpysz et al, 2010). Criptorquidia (testículo no descendido, testículo retenido o testículo mal descendido) es una



condición anormal del testículo, que hace referencia a la ausencia del testículo en el escroto, estando situado en algún punto de su trayecto normal de descenso (Pomero y Arrondo, 1994; Ayala, 1995). Se ha propuesto que la criptorquidia forma parte del "síndrome de disgenesia testicular" (TDS, por sus siglas en inglés), que también incluye patologías como hipospadias, reducción de la calidad del semen y el cáncer testicular (Virtanen et al, 2007).

La criptorquidia puede presentarse como un trastorno aislado en niños sanos, pero también puede ser parte de trastornos genéticos, endocrinos o anatómicos (Virtanen et al, 2007).

1.5.1 INCIDENCIA Y CLASIFICACIÓN

La frecuencia de la criptorquidia puede variar en las diferentes poblaciones, sin embargo a nivel mundial oscila entre un 2% al 4% de los varones nacidos vivos (Hutson et al, 2010). En niños prematuros se incrementa hasta el 30%. Estas cifras disminuyen del 1% a 2% durante los 3 primeros meses de vida postnatal debido al descenso espontáneo, causado por la transitoria activación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo que ocasiona el incremento en la concentración de hormonas esteroideogénicas, que son importantes para concluir el descenso testicular (Hutson y Clarke, 2007; Bay et al, 2011). Cabe mencionar que en México, no se tienen datos epidemiológicos que nos orienten sobre la incidencia de la criptorquidia.

La criptorquidia puede afectar uno o ambos testículos, aunque lo más frecuente es la criptorquidia unilateral, en un 70% aproximadamente. El descenso espontáneo de estos testículos ocurre en un 50 a 70 % de los casos, usualmente en los primeros tres meses de vida (Spencer y González, 2003). Es poco probable el descenso espontáneo de los testículos ubicados en el tercio superior del canal inguinal y aquellos asociados a bolsas escrotales hipoplásicas (Grupo JRHCS, 1986).

Una vez definida clínicamente la criptorquidia, se puede clasificar de acuerdo a la ubicación del testículo en el canal inguinal. Cuando el testículo está ubicado en el tercio inferior del canal inguinal corresponde a criptorquidia grado I, cuando se encuentra en el tercio medio es grado II y en el tercio superior es grado III. Si el testículo no se palpa a nivel inguinal se considera una criptorquidia intra-abdominal o grado IV (Gómez, 2004) (fig. 7).

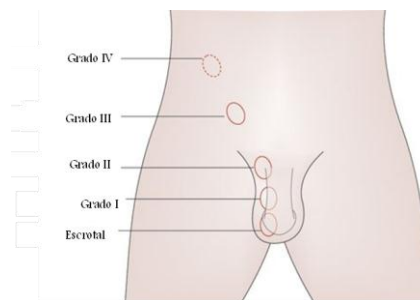


Figura 7: Esquema que muestra la posición del testículo criptorquidico (Modificado de Bay et al, 2011), en donde se observa el testículo desde grado I a IV.

1.5.2 ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El establecimiento de un eje-hipotálamo-hipófisis-gónada anatómica y funcionalmente es necesario para que se lleve a cabo el descenso testicular normal. Este mecanismo de descenso requiere de la compleja interacción tanto de factores endócrinos u hormonales, mecánicos y anatómicos, por lo que las causas de la criptorquidia pueden ser variables (Hutson y Donahue, 1986; Elder, 1988; Cortes, 1998).

1.5.3 FACTORES ENDÓCRINOS

Se cree que las causas más comunes del criptorquidismo se pueden deber a defectos en la secreción prenatal de andrógenos y/o deficiencias en la estimulación de las gonadotropinas hipofisarias, o su baja producción (Hutson y Donahue, 1986). Aunque actualmente se ha demostrado que existen algunas deficiencias de andrógenos que provocan una función anormal del NGF y como



consecuencia una falla en la migración del gubernáculo (Hutson et al, 1997; Cortes, 1998). Así mismo se han reconocido patologías endócrinas, tales como defectos en la síntesis de testosterona y MIS o en la función de sus receptores, causando criptorquidismo (Ayala, 1995; Cortes, 1998; Chrisstiansen et al, 2002).

La relación que se establece entre la placenta y la gónada parece ser también muy importante y se ha demostrado que el mal funcionamiento de la placenta está relacionada con la disminución en la secreción de gonadotropina coriónica humana (hCG por sus siglas en inglés), la cual es una hormona producida durante el embarazo por el embrión en desarrollo después de la concepción y posteriormente por el sincitiotrofoblasto (parte de la placenta). La hCG también es producida en la glándula pituitaria de los hombres y mujeres de todas las edades. Se produce por células trofoblásticas en las mujeres embarazadas, estimula la maduración del óvulo y en los hombres la producción de testosterona en los testículos. La disminución de hCG durante el embarazo que resulta un factor fundamental para el desarrollo de la criptorquidia (Cain et al, 1994a, b; Husmann y Levy, 1995; Hughes y Acerini, 2008; Virtanen y Toppari, 2008; Kurpisz et al, 2010).

Además, se ha propuesto que los altos niveles de estrógenos maternos que se producen durante la gestación son un factor importante para desarrollar criptorquidia, aunque su papel dentro del proceso de descenso testicular no ha sido descrito en su totalidad, sin embargo se sabe que inhiben la producción de INSL3, que se considera un punto clave de inicio en el proceso del descenso testicular (Depue et al, 1983; Hadziselimovic et al, 2000; Virtanen y Toppari, 2008; Foresta et al, 2008).

Se ha surgido que los factores ambientales también pueden jugar un papel en el aumento del riesgo de criptorquidia en los seres humanos. La exposición a factores ambientales, es decir, a compuestos organoclorados persistentes, ftalatos monoésteres y el tabaquismo, se han vinculado a los



efectos adversos en el desarrollo reproductivo infantil. La diabetes materna, incluyendo la diabetes gestacional, también parece ser un factor de riesgo para el desarrollo de la criptorquidia (Virtanen et al, 2007).

La relación entre la criptorquidia, hipospadias y los factores ambientales-xenoestrógenos, ha sido examinada y los resultados apoyan la hipótesis de que el medio ambiente puede afectar la diferenciación sexual masculina en humanos. Se sabe que el descenso testicular depende de una relación equilibrada de hormonas esteroideas (andrógenos), por lo tanto es muy sensible a la alteración de los estrógenos exógenos (Fernández et al, 2007 y Wang et al, 2007). Los xenoestrógenos pueden provocar un desequilibrio hormonal lo que lleva a una maduración inadecuada de las células de Sertoli y de las células de Leydig. Sin embargo, algunos autores, no han encontrado alguna asociación entre la criptorquidia y la exposición materna a los xenoestrógenos (o pesticidas) durante el embarazo (Fernández et al, 2007). La criptorquidia puede estar asociada con un haplotipo específico del gen receptor de estrógeno alfa. Se ha propuesto que la homocigosis para este haplotipo podría aumentar la susceptibilidad a los efectos de los disruptores endocrinos ambientales de origen estrogénico (Virtanen y Toppari, 2008).

1.5.4 FACTORES ANATÓMICOS

Entre los factores anatómicos que podrían afectar el descenso testicular se encuentra la presión de la cavidad abdominal, que es muy importante sobre todo a nivel del canal inguinal, ya que en recién nacidos o lactantes con alteraciones de la musculatura abdominal, hernias umbilicales y otros procesos, que tienden a disminuir la presión intraabdominal, se presenta con elevada frecuencia el testículo ubicado en el orificio inguinal interno, no encontrándose ninguna otra causa que haya impedido el descenso. También uno de los síndromes asociados a la presencia de criptorquidia es el síndrome de Prunne-Belly o también llamado “ciruela pasa”, que se caracteriza por una debilidad de la musculatura abdominal (Husmann y Levy, 1995).



También se ha propuesto como factor mecánico, el desarrollo anormal del gubernáculo o alteraciones en la inervación del nervio genitofemoral o en otras estructuras asociadas al descenso, así como las hernias inguinales, que resultan de un cierre incompleto del proceso vaginal (Berkowitz et al, 1995).

1.5.5 FACTORES GENÉTICOS

La criptorquidia es un padecimiento multifactorial en el cual existen evidencias que sostienen la presencia de factores genéticos asociados a la criptorquidia, como múltiples genes que intervienen en el proceso de descenso testicular (Ashley et al, 2010). Se ha observado en muchas ocasiones que personas que presentan criptorquidia unilateral, el testículo contralateral (normalmente descendido) presenta malignidad (Foresta et al, 2008; Massart y Saggese, 2010). Dichos hallazgos sugieren que la criptorquidia puede ser considerada fundamentalmente como un signo de una alteración congénita.

La criptorquidia frecuentemente se presenta como un signo o un componente común de cerca de 250 síndromes que se encuentran asociados con aberraciones cromosómicas, muchos casos involucran cromosomas sexuales, sin embargo también se pueden presentar alteraciones en cromosomas autosómicos. Por otra parte en un gran número de pacientes con criptorquidia, esta malformación aparece como un rasgo aislado, sin la asociación a ningún síndrome, la presencia de la criptorquidia en esta condición es conocida como criptorquidia idiopática o no sindrómica (Foresta et al, 2008; Massart y Saggese, 2010).

Por otro lado, la criptorquidia bilateral es la más frecuentemente asociada con alteraciones cromosómicas (5%) en comparación con la forma unilateral (3%) (Foresta et al, 2008; Massart y Saggese, 2010).



Las anomalías cromosómicas frecuentemente asociadas a la criptorquidia son las relacionadas con cromosomas sexuales, dando lugar a síndromes que se caracterizan por defectos en la función hipotalámica y/o hipofisiaria, ocasionando alteraciones en la producción de gonadotropinas, en la síntesis de andrógenos o en la acción androgénica, que son claves para el proceso de descenso testicular (Hadziselimovic et al, 1987, Foresta et al, 2008).

En años recientes, se ha dado particular atención a algunos genes involucrados en el proceso de descenso testicular, especialmente en el desarrollo gubernacular. Muchos de estos genes denominados morfogenéticos tales como: el *INSL3* y el *RXFP2* que en realidad es el receptor de *INSL3*, ambos genes traducen proteínas que actúan como sistema ligando/receptor y juntos participan en la regulación del descenso testicular. Otro gen importante involucrado en el descenso testicular es *HOXA10* que codifica a una proteína que interviene sobre todo en el desarrollo embrionario, regula factores de transcripción específicos y controla el crecimiento y diferenciación de células gubernaculares (Foresta et al, 2008; Massart y Saggese et al, 2010). Estos genes hasta la fecha han sido estudiados en diferentes poblaciones distintas a la población mexicana.

1.5.6 EFECTOS A LARGO PLAZO

Los hombres con historia clínica de criptorquidia uni o bilateral tienen alteraciones en la calidad del semen, disminuyen la concentración y la motilidad además de que se altera la espermatogénesis, lo cual compromete la fertilidad. Se reporta que la población en general muestra una tasa de paternidad del 85% y en los varones con criptorquidia unilateral sometidos a orquidopexia ésta es del 65-80% y se reduce al 50-60 % en aquellos sometidos a orquidopexia bilateral (Yturriaga y Pérez, 2002).

En los niños con criptorquidismo la producción de gonadotropinas es deficiente; provocando anomalías en la maduración de las células



germinales y en la función endócrina del testículo culminando con esterilidad. Las células de Leydig no proliferan y por consiguiente no se presenta la oleada de testosterona que llevaría a la maduración de las células germinales (Ozen et al, 1989; Ring et al, 1990; Rosansky y Bloom, 1995).

En biopsias testiculares realizadas a niños criptorquídicos se ha observado una disminución en el número de células de Leydig, retraso tanto en la diferenciación de gonocitos como en la aparición de espermatogonias oscuras, fallas en el desarrollo de espermatocitos primarios y un bajo número de células germinales (Setchell et al, 2001, 2002). La degeneración secundaria de los testículos criptorquídicos está relacionada con la elevación de la temperatura (35 a 37°C). La esteroidogénesis comienza a tener trastornos a los pocos meses del nacimiento (O'Shaughness et al, 2007; Steinberger, 1991).

La diferencia de temperatura entre el lecho escrotal y la cavidad abdominal es de un grado centígrado. En estudios experimentales se ha observado que ese aumento de temperatura puede alterar el desarrollo del testículo, específicamente el diámetro tubular, el cual depende principalmente de la maduración de las células de Sertoli (Nistal y Paniagua, 2003).

Todos los pacientes con criptorquidia tienen un proceso vaginal abierto que favorece el desarrollo de una hernia indirecta y su presencia indica que se debe efectuar orquidopexia. El testículo criptorquídico tiene mayor peligro de torsión del cordón y de sus apéndices que un testículo normal. La aparición de un tumor de células germinales en un niño con criptorquidia es muy probable, pero el periodo latente para su desarrollo es de más de 20 años. En el adulto, las probabilidades de que ocurra malignización son de 7 a 10 veces más para un testículo criptorquídico que para uno normal (Ayala, 1995; Taskinen y Wikstrom, 1997; Shin et al, 1997).

El riesgo de malignidad en el testículo con criptorquidia se incrementa entre 5–10 % sobre la población normal (Pinczowski et al, 1991). El desarrollo



tumoral es más frecuente en los testículos que han permanecido más tiempo fuera de la bolsa escrotal. Sin embargo, no está demostrado que la intervención precoz reduzca el riesgo degenerativo aunque un testículo descendido hasta la bolsa escrotal es más fácil de evaluar y se puede detectar tempranamente una alteración estructural (Swedlow et al, 1997).

1.6 CÁNCER TESTICULAR

La mayoría de los tumores testiculares derivan de las células germinales. En menor número se pueden observar tumores de células somáticas, conocidas como tumores de cordón-estromal sexual y tumores de células de Leydig (Hoei-Hansen et al, 2005).

Los estudios de Skakkebaek et al, han establecido que la mayoría (más del 95%) de los tumores testiculares de células germinales (TGCTs por sus siglas en inglés) surgen de células germinales intratubulares malignas que se caracterizan por ser morfológicamente distintas (Skakkebaek et al, 1987). Estos trabajos apoyan una vía común para los diferentes tipos morfológicos de tumores de células germinales y reafirman el abordaje a la nomenclatura de la OMS (Organización Mundial de la Salud).

Más del 95% de los tumores testiculares son de origen de células germinales y se pueden dividir en dos tipos principales: seminomas y no seminomas. Este último tipo puede albergar uno o varios componentes, incluyendo el carcinoma embrionario, teratoma, poliembrioma, coriocarcinoma o tumor del saco vitelino (tabla 1), (Ulbrigh et al, 1999).

TABLA 1. Clasificación del tumor de células germinales
Lesiones precursoras <ul style="list-style-type: none">❖ Neoplasia de células germinales intratubular❖ Tipo no clasificado (Carcinoma in situ)
Seminoma <ul style="list-style-type: none">❖ Seminoma❖ Seminoma con células sincitiotrofoblasticas❖ Seminoma espermatocítico
No seminoma <ul style="list-style-type: none">❖ Carcinoma embrional❖ Tumor de saco vitelino❖ Tumores trofoblásticos<ul style="list-style-type: none">• Coriocarcinoma monofásico• Tumor trofoblástico placentario• Tumor trofoblástico cístico❖ Teratoma<ul style="list-style-type: none">• Cístico dermoide• Cístico epidermoide• Teratoma monodermal (carcinoide, tumor neuroectodermal primitivo (PNET), tumor ligado a nefroblastoma, otros).• Teratoma tipo somático-maligno❖ Tumores de más de un tipo histológico (forma mixta)<ul style="list-style-type: none">• Carcinoma embrional y teratoma• Teratoma y seminoma• Coriocarcinoma, teratoma y carcinoma embrionario• otros

Tabla 1: Clasificación de tumores de células germinales, según la OMS (Modificado de Winter y Alberts, 2011).



Los tumores de células germinales del testículo y la gónada disgénica se han encontrado en gónadas de pacientes con alteraciones en la diferenciación sexual que desarrollan seminoma (Russell et al, 1990). El desarrollo de este tumor invasivo siempre precede a una lesión neoplásica *in situ* conocida como neoplasia de células germinales intratubular no clasificable (ITGNU por sus siglas en inglés), comúnmente conocida como CISt (Cools et al, 2006; Looijenga et al, 2007).

Prácticamente todos los TGCT se cree proceden de un precursor común, el CISt (Skakkebaek, 1972), con la excepción de los raros seminomas espermatocíticos que se presentan en hombres de edad avanzada, y los tumores infantiles (tumores del saco vitelino y teratoma maduro). En la actualidad, muy pocos pacientes son diagnosticados con CISt, a pesar de que éste casi invariablemente, se convierte en un cáncer testicular (Hoei-Hansen et al, 2011).

1.6.1 CISt

Se ha propuesto a los gonocitos como los responsables del desarrollo de esta patología (Risk y Masterson, 2010), y se cree que pueden mantenerse como pluripotenciales, expresando proteínas de células indiferenciadas, que coinciden con marcadores del CISt (Rajpert, 2006, Risk y Masterson, 2010). También se ha demostrado que la cromatina de las células de CISt tienen una estructura similar a la de los gonocitos fetales lo cual se asocia con una alta actividad proliferativa y transcripcional, procesos necesarios para una transformación neoplásica (Almstrup et al, 2010).

Las células del CISt son células grandes con nucléolos, que en un patrón típico se encuentran en una sola fila en la membrana basal engrosada de los túbulos seminíferos, y que han reducido su diámetro (Fig. 8) (Sigg y Hedinger, 1984). La suposición de que las células del CISt son las precursoras

del TGCT es apoyada por la observación frecuente de células del CIS_t en el parénquima testicular que rodean al cáncer invasivo, así como el desarrollo de TGCT invasivo en pacientes en los que el CIS_t ha sido diagnosticado anteriormente (Hoei-Hansen et al, 2011).

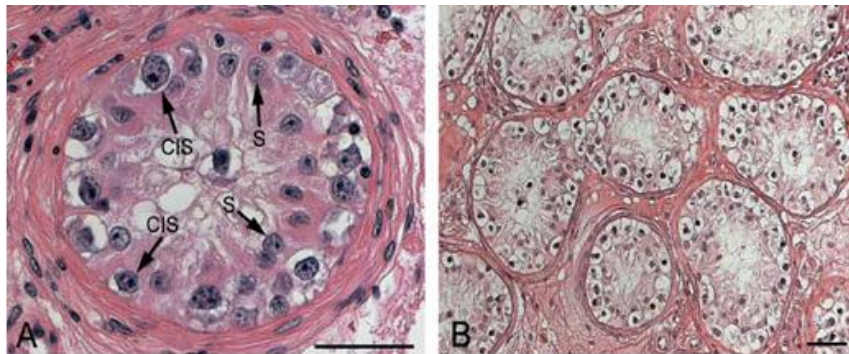


Figura 8: Histología del CIS (A, B) Sección de una biopsia de testículo que contiene tubos seminíferos con abundantes células características del CIS_t. Células de Sertoli (S), hematoxilina-eosina (Modificado de Hoei-Hansen et al, 2011).

El parénquima testicular con CIS_t es frecuentemente atrófico y puede contener signos de disgenesia tubular completamente indiferenciado, la espermatogénesis pobre y microlitiasis (microcalcificaciones), (Hoei-Hansen et al, 2003). Los testículos prepuberales ocasionalmente pueden albergar células CIS en pequeñas cantidades y su morfología no solo se parece a las células del CIS_t para adultos, sino también a gonocitos infantiles en muchos aspectos, por lo que el CIS_t prepuberal puede ser difícil de diagnosticar (Muller et al, 1984). Las células del CIS_t permanecen en reposo durante la infancia, seguida de la proliferación en la pubertad, probablemente debido a la estimulación hormonal (Hoei-Hansen et al, 2011).

Se propone que el inicio de la transformación maligna se lleva a cabo en el útero durante el desarrollo temprano de las células madre de la línea germinal y la célula responsable sea probablemente un gonocito. Esta hipótesis se basa inicialmente en la semejanza morfológica entre las células del CIS_t y los gonocitos (Skakkebaek et al, 1987 y Nielsen et al, 1974), con estudios posteriores se ha demostrado una superposición de algunos patrones de

expresión de varias proteínas entre los gonocitos fetales y las células del CIS_t, como son el c-Kit (Jorgensen et al, 1995), OCT3/4 (Rajpert et al, 2004) y AP-2γ (Hoei-Hansen et al, 2004), que no son detectables en los testículos adultos (Hoei-Hansen et al, 2011).

1.6.2 ETIOLOGÍA DEL SEMINOMA

Los seminomas son generalmente compuestos por células uniformes dispuestas en hojas o divididas en grupos o columnas, por trabéculas fibrosas bien asociadas con un infiltrado linfocitario, que puede ser denso, con formación de folículos. Los seminomas por lo general eliminan la arquitectura testicular pero los patrones de otros factores de crecimiento incluyen: invasión intersticial (o microinvasión) en un pequeño tumor insuficiente para producir una masa palpable o macroscópica o en el borde de un tumor de gran tamaño y la infiltración intratubular (fig. 9) (Osmuro, 2004).

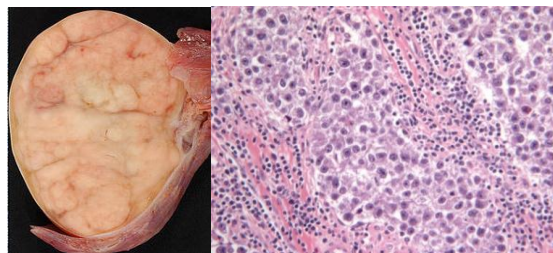


Fig 9: Estructura anatómica e histológica del seminoma, en donde se observa atrofia testicular propia del seminoma en tejido testicular (Osmuro, 2004).

Los factores de riesgo maternos para el desarrollo de tumores testiculares de células germinales son la edad de la madre durante el embarazo, el tabaquismo materno, niveles elevados de estrógeno de la madre que pueden tener un papel importante en la patogénesis del cáncer testicular (McGlynn et al, 2008). Ciertas alteraciones genéticas también pueden predisponer a los individuos para el desarrollo de tumores testiculares de células germinales. Varios estudios han demostrado que los tumores testiculares de células germinales se caracterizan por una alteración del brazo corto del cromosoma 12 y que esta alteración genética se encuentra en casi



todos los pacientes con tumores testiculares de células germinales (Korkola et al, 2009 y Korkola, 2009).

Las investigaciones clínicas y básicas han proporcionado conocimientos sobre aspectos básicos y clínicos del CIST y su desarrollo a seminoma, permitiendo su diagnóstico temprano en base a exámenes clínicos completos en combinación con la ecografía y biopsia testicular (Hoei-Hansen et al, 2011).

En los hombres adultos con antecedentes de criptorquidia, la prevalencia del CIST es 2-4% (Giwerzman et al, 1989), que corresponde bien con la incidencia conocida de TGCT en este grupo. Hay un mayor riesgo de CIST en pacientes con criptorquidia, independientemente de la edad de la orquidopexia quirúrgica (Hoei-Hansen et al, 2011).

Debido a que el desarrollo de tumores germinales se relaciona a eventos durante la gonadogénesis fetal, se piensa que la célula germinal maligna es la contraparte de la célula germinal primordial o gonocito. Algunos marcadores inmunohistoquímicos expresados por células germinales primordiales en etapas tempranas del desarrollo, pueden ser usadas para el diagnóstico de los TGCT (Osterhuis et al, 2005). Estos marcadores tumorales incluyen; OCT3/4, c-Kit y FA (Looijenga et al, 2003; Jong et al, 2005).

El hallazgo de la expresión del OCT3/4 en CIST/seminoma ha dado crédito a la hipótesis de que estos tumores de células germinales son resultado de una falla en la diferenciación de las PGCs a los gonocitos., una hipótesis basada originalmente en la similitud morfológica entre células fetales/neonatales y las células tumorales germinales (Almstrup et al, 2004;. Kristensen et al, 2008.).

Se ha propuesto a los gonocitos como los responsables del desarrollo del CIS (Risk y Masterson, 2010), y se cree que pueden mantenerse como pluripotenciales, expresando proteínas de células indiferenciadas tales como:

OCT3/4 (Rajpert et al, 2004), c-Kit (Jorgensen et al, 1995), AP-2 γ , NANOG y FA (Hoei-Hansen et al, 2004b), que coinciden con marcadores del CIST (Rajpert, 2006, Risk y Masterson, 2010). En la tabla 2 se describen las proteínas de pluripotencialidad y marcadores del CIST.

Proteínas que se expresan en gonocitos y células del CIST

Proteína/ antígeno (gen)	ESC	PGC	Gonocitos	Sp-gonia	Sp-cytes	Sp-tids	CIS	SEM	N-SEM		SpSEM
									EC	TER	
NANOG	+	+	+				+	+	+		
OCT3/4 (<i>POU5F1</i>)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
AP-2 γ (<i>TFAP2C</i>)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-/+	-
TRA-1-60	!	!	!/-	-	-	-	!/-	!/-	!	-	-
PLAP (<i>ALPL</i>)	-	+	+	-	-	-	+	+	+/-	-	-
M2A (<i>PDPN</i>)	?	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
KIT	+	+	+/-	-/+	-	-	+	+	-	-	-
DAZL1	?	+	+	+/-	+	-	+	+/-	-	-	?
VASA	?	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	-	-	+
Hirwi	?	+	+	+	+	+/-	+	+/-	-	-	?
TSPY	?	?	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Cyclin D2 (<i>CCND2</i>)	?	?	+	-	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+?
MAGE-A4	?	-	+	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+
NY-ESO-1	?	-	+	+	+	-	+/-	-	-	-	+/-

EC, Carcinoma embrionario; ESCs, Células *stem* embrionarias; N-SEM, no-seminoma; PGC, Células germinales primordiales; SEM, seminoma; Sp-cytes, espermatoцитos; Sp-espermatogonia; SpSEM, seminoma espermatoцитico; Sp-tids, espermatidas; TER, teratoma.

Una fuerte expresión se caracteriza por +, una expresión heterogénea por +/- . Un signo menos significa que una proteína no es detectable por inmunohistoquímica, pero pueden estar presentes en un tipo de célula en cantidades extremadamente bajas y el gen puede ser altamente expresado en el nivel de ARN, Un signo de interrogación significa que no hay información sobre la presencia de proteínas.

Tabla 2: Lista de las proteínas, que se expresan en células del CIST, expresión en células germinales normales humanas masculinas durante su diferenciación y maduración, en relación a la expresión en células germinales de tumores testiculares (Modificado de Rajpert, 2006).



2. JUSTIFICACIÓN

La criptorquidia es el defecto congénito al nacimiento más frecuente en humanos, En México, hasta la fecha, no se cuenta con datos epidemiológicos sobre la criptorquidia, pero se estima, en base a estadísticas, que la frecuencia oscile entre 10 y 20,000 casos nuevos de criptorquidia al año (comunicación personal), lo que constituye una cifra alarmante, sobre todo considerando que este padecimiento tiene una gran repercusión en la salud reproductiva del varón en estado adulto y además es considerada una de las causas de presentar cáncer testicular ya que incrementa el riesgo de desarrollar CIST, el precursor del seminoma.

Se ha propuesto al gonocito como el responsable del desarrollo del CIST, ya que ambos, gonocitos y CIST, coinciden en expresar proteínas de pluripotencialidad. Se menciona que los gonocitos se mantienen indiferenciados en los pacientes con criptorquidia, lo cual los hace susceptibles a la malignidad. Aunando a este hecho, la falta de diferenciación en la ventana de tiempo, genera la ausencia de espermatogonias que repercute en la fertilidad en estado adulto.

Con base en estos antecedentes, resulta importante el determinar la presencia de estas proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación (OCT3/4, c-Kit y FA) en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia, que participan y estimulan el desarrollo del CIST y posteriormente un seminoma. Estos conocimientos aportarían mas elementos para entender mejor la etiología y la fisiopatología de la enfermedad, con esto probablemente, en un futuro, se logrará diagnosticar tempranamente dicha patología y reducir el riesgo de desarrollar cáncer testicular e infertilidad.

Es importante destacar que este proyecto se apega a una de las líneas prioritarias de investigación de nuestro Instituto denominada “salud reproductiva” y “Cáncer en el niño y el adolescente”, Dado el impacto en la



salud del varón, el cáncer testicular, recientemente se incorporó en la cobertura del Seguro Popular en nuestro país.

3. HIPOTESIS

- Los gonocitos de niños con criptorquidia no se diferencian y siguen expresando factores de pluripotencialidad (OCT3/4, c-Kit y FA).

4. OBJETIVO GENERAL

- Analizar si en pacientes con criptorquidia los gonocitos conservan su pluripotencialidad y no se diferencian.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Detectar por inmunohistoquímica la presencia de proteínas de pluripotencialidad (OCT3/4, c-Kit y FA) durante y después del periodo de diferenciación de los gonocitos en niños y jóvenes con criptorquidia.
- Correlacionar los resultados inmunohistoquímicos con, la morfometría e histopatología de los tejidos de pacientes con criptorquidia, para correlacionar las alteraciones morfológicas e histopatológicas con la expresión de marcadores de pluripotencialidad e indiferenciación.



6. MATERIAL Y MÉTODOS

UBICACIÓN DEL ESTUDIO

Se realizó en el laboratorio de Biología de la Reproducción de la torre de investigación “Dr. Joaquín Cravioto” y en el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría.

6.1 Consideraciones éticas

Las muestras de los pacientes se obtuvieron del archivo del Departamento de Patología y se manejaron respetando la confidencialidad de los mismos. Los tejidos únicamente se emplearon para los fines del presente trabajo.

Se revisaron 1500 expedientes procedentes del archivo del Departamento De Patología del Instituto Nacional de Pediatría, considerando los siguientes criterios.

6.2 Criterios de inclusión: Se incluyó todo tejido testicular de niños y jóvenes con criptorquidia con presencia de células germinales y controles sin patología testicular aparente, a término, desde recién nacidos hasta los 18 años.

6.3 Criterios de exclusión: se eliminó todo tejido testicular mal fijado o que no permitió visualizar la estructura testicular y que fue negativo a vimentina, un marcador constitutivo celular que permitió evaluar la integridad y conservación del tejido.

Para el grupo control se excluyó todo tejido testicular con alguna de las patologías incluidas en el anexo I.



Se seleccionaron 41 biopsias testiculares (pacientes con criptorquidia) provenientes de niños y jóvenes con criptorquidia bilateral, abdominal e inguinal y 30 autopsias testiculares de pacientes sin criptorquidia (controles), en este, la causa de muerte fue ajena a la función reproductiva. Se incluyó a niños desde el nacimiento y jóvenes hasta los 18 años de edad.

6.4 Inmunohistoquímica (IHQ)

Antes de realizar la técnica de IHQ para cada proteína (OCT3/4, c-Kit y FA), cada tejido fue evaluado con vimentina una proteína estructural que nos permitió determinar la preservación de cada tejido y posteriormente evaluarlo con cada anticuerpo utilizado.

Para la estandarización de la técnica de cada anticuerpo, se seleccionaron tejidos, controles positivos (testículo, apéndice y placenta) y negativos (testículos). Para el desenmascaramiento o exposición de epítopes se emplearon diferentes soluciones de desenmascaramiento. Las diluciones del anticuerpo primario fueron seleccionadas con base a las recomendadas en el inserto de cada anticuerpo, empezando de la más baja a la más alta.

6.5 Estandarización de la técnica

Se incluyó todo tejido testicular positivo a vimentina y que presentara reacción en los diferentes tejidos seleccionados como positivos. En la figura 10, se observan los controles positivos para cada anticuerpo, vimentina una proteína fibrosa que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, presenta una reacción positiva en tejido de apéndice (fig. 10A). El c-Kit marcó la membrana de las células del apéndice (fig. 10B), el OCT3/4 un marcador nuclear que fue positivo en células germinales en testículo de un niño de 21 días (fig. 10C) y finalmente FA se observa positivo en células de placenta (fig. 10D).

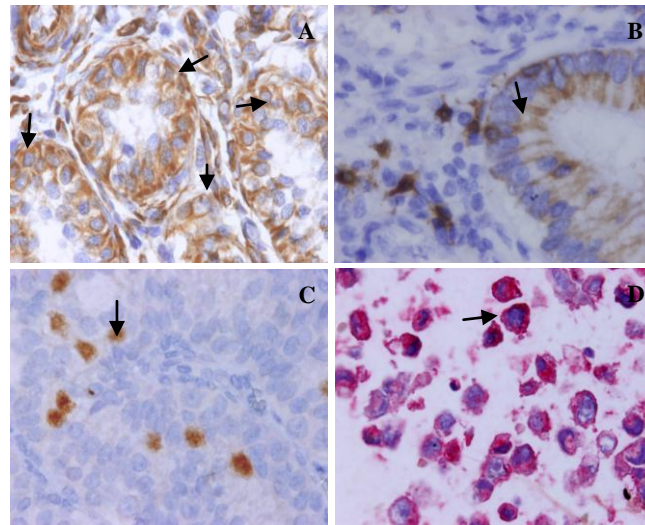


Figura 10: Controles positivos para cada uno de los anticuerpos utilizados A) Vimentina en tejido testicular de un paciente de 6 años de edad; B) c-Kit positivo en tejido de apéndice; C) OCT3/4 positivo en testículo de niño de 21 días de edad y D) FA positivo en tejido de placenta. Inmunohistoquímica, 60X.

Se realizaron cortes de 2 μm de grosor y se montaron en portaobjetos preparados con solución de poli-l-lisina 0.1% (SIGMA-ALDRICH). El proceso de recuperación de antígenos, se realizó empleando una solución de citrato de sodio 1X (Diva Decloaker, BIOCARE Medical) y de E.D.T.A 1X (EDTA Decloaker, BIOCARE Medical), además de la aplicación de calor y presión en la olla de presión de polipropileno de alta densidad/microondas (Microwave Tender Coker, E. U), durante 5 minutos. Para inhibir la peroxidasa, agregamos solución de Peróxido de Hidrógeno al 0.9%, durante 5 minutos y se realizaron 3 lavados posteriores con agua destilada, durante 5 minutos cada uno.

Para la determinación inmunohistoquímica de las proteínas de pluripotencialidad (OCT3/4, c-Kit y FA) empleamos anticuerpos primarios (Anexo II), incubados durante 40 minutos y continuamos con un sistema de biotina-estreptavidina/peroxidasa (SBEP), (inmunodetector HRP/DAB, BIOSB) y biotina-estreptavidina/fosfatasa alcalina (SBEFA), (inmunodetector HRP/FA, BIOSB) durante 1 hora. Para OCT3/4 después del anticuerpo primario, se utilizó un sistema de tinción libre de biotina (Enhanced Polymer-One-Step, EPOS), (Mach 2 Mouse HRP/Polymer, BIOCARE Medical), para amplificar la

señal de la reacción. Y para hacer evidentes los sitios de unión al anticuerpo se utilizó 3,3 diaminobencidina (DAB) y nueva fucshina.

Posteriormente las laminillas fueron contrastadas con hematoxilinas de Gill, deshidratadas, aclaradas y montadas con resina sintética.

6.6 Análisis semicuantitativo

Se observó la inmunoreactividad de los tejidos de cada uno de los anticuerpos comparado con su respectivo control y se hizo un análisis semicuantitativo. Acordamos asignar valores de 0 para aquel tubo con ninguna célula positiva, el valor de 1 para tubos con 1 a 2 células positivas, el valor de 2 para tubos con 3 a 6 células positivas, el valor de 3 para aquel tubo con 7 a 20 células positivas y el valor de 4 sólo para tejidos con más de 20 células positivas y que solo correspondieron a vimentina (figura 11).

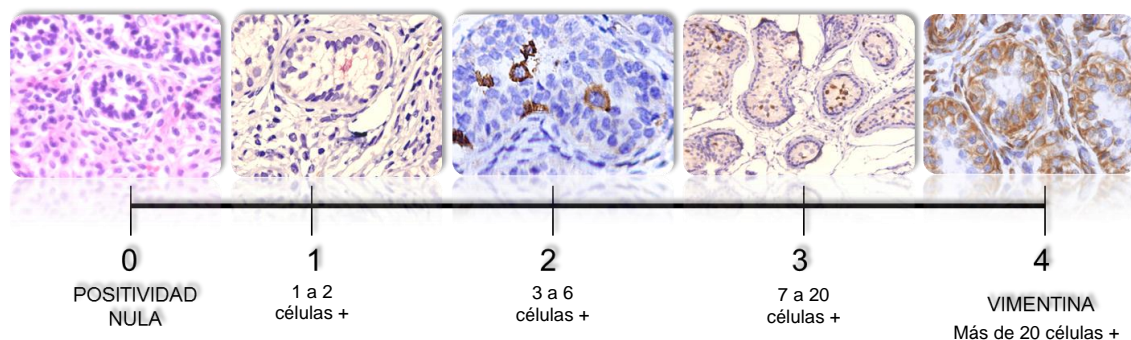


Figura 11: Análisis semicuantitativo, asignación de valores de 0 a 4 de acuerdo a la cantidad de células positivas por cordón/tubo seminífero.

6.7 Estadística descriptiva

El valor que se les dio con respecto a la inmunoreactividad se evaluó sacando un promedio (media) por grupo de edad y anticuerpo utilizado.

Los grupos de edades fueron divididos con respecto al desarrollo y madurez del testículo. De 0 a 1 años es una etapa en donde el testículo está en



desarrollo y las poblaciones celulares en constantes divisiones y diferenciación (Lacham, 2004), de 2 a 10 años se definió como una etapa de quiescencia, de 11 a 15 años una etapa en donde se inicia la espermatogénesis y de 16 a 18 años etapa en la cual la espermatogénesis ya está bien establecida (Fabre et al, 2009).

6.8 Análisis morfométrico

Para la morfometría de los tubos seminíferos se obtuvieron cortes de 5 μ m de grosor, teñidas con H-E. Por cada testículo se observaron de 15 a 20 tubos seminíferos. Las áreas de los tubos seminíferos las obtuvimos con un sistema de análisis de imágenes (image-Pro Plus 5.1, USA) evaluando únicamente tubos cortados transversalmente.

6.9 Análisis histopatológico

El análisis histopatológico se basó en analizar las alteraciones histológicas del epitelio seminífero, considerando principalmente alteraciones evidentes y propias del testículo criptorquídico como, grosor de la membrana tubular, presencia de células atípicas dentro de los tubos seminíferos, microlitiasis, hipoplasia de células testiculares, espermatogénesis ausente o incompleta y hemorragia testicular.

De un total de 1500 expedientes revisados, se realizó una selección con base a los criterios de inclusión y de exclusión, así se obtuvieron 41 tejidos testiculares de pacientes con diagnóstico de criptorquidia y que histológicamente presentaron células germinales además de ser positivos a vimentina y 30 tejidos testiculares de pacientes controles sin ninguna patología testicular aparente, nacidos a término y que también fueron positivos a vimentina.



7. RESULTADOS

7.1 Grupo de 0 a 1 año de edad

Inmunoreactividad

En este grupo de edad se contó con pacientes controles de 0 a 6 meses de edad. En estos pacientes la inmunoreactividad para c-Kit, OCT3/4 y FA fue alta hasta los primeros 6 meses en general. Para los pacientes con criptorquidia se contó con pacientes sólo de 1 año de edad y en los cuales, la inmunoreactividad fue positiva a estas proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación.

Finalmente se pudo observar que en el grupo de pacientes controles la inmunoreactividad para OCT3/4 y c-Kit fue menor comparado con FA ya que para OCT3/4 se observaron 6 tejidos testiculares positivos, para c-kit 4 tejidos con positividad y para FA fueron 9 tejidos testiculares positivos.

En la tabla 3 se muestra la expresión de marcadores de pluripotencialidad (OCT3/4, c-Kit y FA). Se presenta el promedio (media \pm error estándar) de la intensidad de reacción de cada uno de los grupos y de cada anticuerpo.

Tabla 3: Expresión de marcadores de pluripotencialidad

MARCADORES				
	EDAD (Años)	OCT3/4 (Germinal)	c-Kit (Germinal)	FA (Germinal)
CONTROLES	0-1	1.83 ± 0.16 (6/12)	2.25 ± 0.25 (4/12)	1.88 ± 0.26 (9/12)
	2-10	0 (0/7)	0 (0/7)	0 (0/7)
	11-15	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)
	16-18	0 (0/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
CRIPTORQUIDIA	0-1	1.5 ± 0.5 (2/5)	1 (2/5)	1.33 ± 0.33 (3/5)
	2-10	1.4 ± 0.24 (5/25)	3 (2/25)	1.66 ± 0.33 (3/25)
	11-15	2 (2/7)	3 (1/7)	2 (2/7)
	16-18	0 (0/4)	0 (0/4)	0 (0/4)

Tabla 3: Se muestra la expresión de marcadores de pluripotencialidad (OCT3/4, c-Kit y FA), tanto en los grupos control como en los grupos de pacientes con criptorquidia distribuidos en cuatro grupos de edades. Se presenta el promedio (media ± error estándar) de la intensidad de reacción de cada uno de los grupos y de cada anticuerpo; entre paréntesis se expresa el número de pacientes positivos sobre el número de pacientes totales. Los números rojos representan los grupos de pacientes mayores al año de edad que fueron positivos a los anticuerpos.

OCT3/4

OCT3/4 se expresó con una inmunoreactividad media de 1.83 ± 0.16 en 6 de los 12 testículos de niños control, los cuales tenían de 2 a 11 días de edad y en los pacientes con criptorquidia disminuyó a 1.5 ± 0.5 en 2 de 5 pacientes (tabla 3), estos dos pacientes fueron de 1 año de edad. Unos de estos pacientes con mayor positividad fue el *paciente número 2* (tabla 4) con un valor de inmunoreactividad igual a 2 y el *paciente número 3* (tabla 4) este paciente con un valor de inmunoreactividad igual a 1, los cuales se describen a continuación.



Paciente número 2, diagnosticado con criptorquidia unilateral derecha inguinal y fue tratado quirúrgicamente retirándole el testículo izquierdo completamente (orquiectomía) para su diagnóstico histológico con H&E, del cual las alteraciones histológicas descritas por el patólogo fueron hipoplasia de células testiculares y ausencia de células neoplásicas testiculares. *Paciente número 3*, fue diagnosticado con criptorquidia unilateral derecha abdominal, fue tratado quirúrgicamente realizándole una orquiectomía del testículo derecho y su diagnóstico histopatológico mostró fibrosis, atrofia leve del testículo además de la presencia de calcificaciones (microlitiasis).

La reacción para OCT3/4 se comportó de forma similar tanto en pacientes como en los niños control durante el primer año de vida, en la figura 12A y B, se observa un tejido testicular de un niño control de 2 meses de edad, que presentó células positivas marcando el núcleo de células germinales que se ubicaron en su mayoría en el centro de los cordones seminíferos, de tal manera que a partir de los 4 meses de edad en adelante ya no se presentó inmunoreactividad positiva a esta proteína. Sin embargo en los pacientes, las células germinales positivas estuvieron localizadas en el centro y cerca de la lámina basal de los cordones seminíferos, lo cual se observó en un paciente de 1 año de edad en la figura 12C y D. Las células que fueron positivas presentaron características morfológicas similares a los gonocitos ya que eran células grandes y pálidas con núcleos redondos y como ya se mencionó, positivo a OCT3/4, además de que estas células se ubicaron en su mayoría hacia el centro de los tubos seminíferos, dicha característica también condiciona a la célula a ser identificada como gonocito.

Marcador de pluripotencialidad OCT3/4(EDAD 0 a 1 AÑOS)

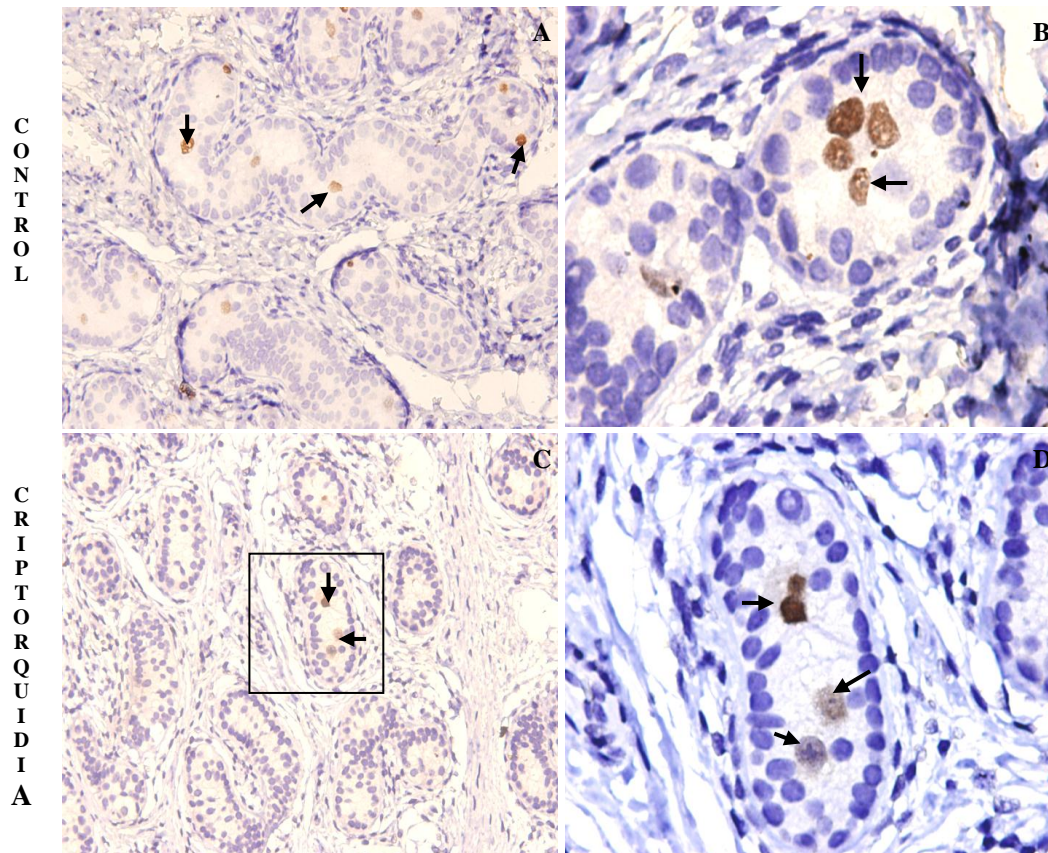


Figura 12: Inmunohistoquímica para OCT3/4 de tejidos testiculares de 0 a 1 años en donde se observa una clara inmunoreactividad nuclear a OCT3/4. A y B) Tejido testicular de un niño control de 2 meses, donde de manera normal se observa una reacción positiva al anticuerpo, en el núcleo de células germinales; C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 1 año 6 meses, donde se observan células positivas en el centro del tubo seminífero. Las flechas indican las células positivas y el cuadro señala la parte amplificada del tejido. Inmunohistoquímica 20 y 60X respectivamente.

c-Kit

La inmunoreactividad media para c-Kit fue de 2.25 ± 0.25 en 4 de 12 niños control, los cuales tenían 11 días y 5 meses de edad respectivamente y en los pacientes 2 de 5 totales fueron positivos con un valor medio de inmunoreacción igual a 1 (tabla 3). Estos pacientes positivos fueron, el *paciente número 2*, con un valor de inmunoreactividad de 2 y el *paciente número 3* con un valor de inmunoreactividad igual a 1 de los cuales ya se describieron sus características anteriormente (tabla 4).



En pacientes controles, se observó la inmunoreactividad para c-Kit durante los primeros 6 meses y durante el primer año de edad en pacientes con criptorquidia. En la figura 13A y B se observa un tejido testicular de un niño control de 2 meses de edad, en el cual hay inmunoreactividad citoplasmática de células germinales ubicadas en el centro y en contacto con la membrana basal de los cordones seminíferos, de tal manera que a partir de los 4 meses de edad en adelante ya no se identificaron células con inmunoreactividad positiva a esta proteína. Pero en el tejido testicular del paciente de 1 año de edad (figura 13C y D), se observa una reacción positiva al anticuerpo, de igual manera la reacción positiva a c-Kit permite identificar a las células como gonocitos, debido a la inmunoreactividad, a la morfología característica y a la ubicación central de dichas células.

Marcador de pluripotencialidad c-Kit (EDAD 0 a 1 AÑOS)

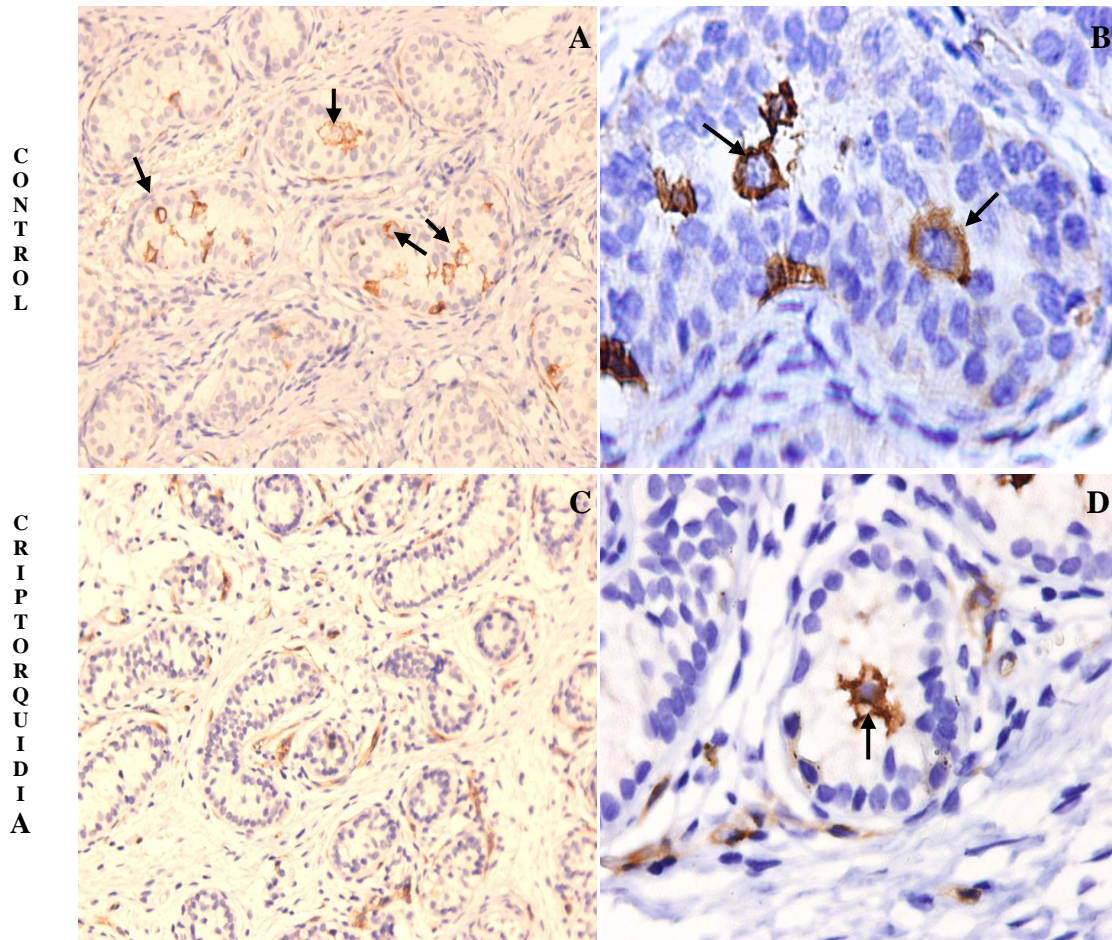


Figura 13: Inmunohistoquímica para c-Kit de tejidos testiculares de 0 a 1 año de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad citoplasmática a c-Kit. A y B) Tejido testicular de un niño control de 2 meses, en donde de manera normal se observa una reacción positiva al anticuerpo; C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 1 año 6 meses de edad en donde se observan células positivas en el centro y periferia de los tubos seminíferos. Las flechas indican las células positivas. Inmunohistoquímica 20 y 60X respectivamente.

FA

En este grupo, la inmunoreactividad media para los factores de pluripotencialidad, fue de 1.88 ± 0.26 en 9 tejidos de niños control de un total de 12, estos controles tenían entre 2 meses a un año de edad. En los pacientes hubo una inmunoreactividad media de 1.33 ± 0.33 en 3 tejidos de un total de 5 (tabla 3), estos pacientes tenían 1 año de edad. En este caso el paciente con mayor inmunoreactividad fue el *paciente número 2* con un valor de inmunoreactividad igual a 2, seguido del *paciente número 3* con una



inmunoreactividad igual a 1; de los cuales ya se describieron anteriormente sus características. Además del *paciente número 1*, que también presentó un valor de inmunoreactividad igual a 1. El cual se describe a continuación.

Paciente número 1, diagnosticado con criptorquidia bilateral abdominal, el tratamiento quirúrgico para este paciente fue realizarle una biopsia de un testículo y orquidopexia para ambos, el diagnóstico histopatológico mostró aplasia de células germinales y atrofia acentuada (tabla 4).

En la figura 14A y B, en el grupo de niños control, en el tejido testicular de 2 meses de edad, se logró observar una reacción positiva a esta enzima en los seudópodos de las células germinales que estaban en migración hacia la membrana basal, de tal manera que a partir de los 4 meses de edad en adelante ya no se presentó inmunoreactividad positiva a esta proteína. Sin embargo, tanto en pacientes como en niños control, FA se expresó durante el primer año de edad en el citoplasma de estas células germinales, en el tejido testicular de un paciente de 1 año de edad se observaron células ubicadas principalmente en el centro del cordón o en células que se encontraban en proceso de migración hacia la membrana basal (fig. 14C y D). La expresión de esta enzima es característica de células germinales y es utilizada por los gonocitos para migrar hacia la membrana basal, por lo que la expresión de dicha enzima y la morfología de las células positivas refieren a estas células como gonocitos.

Marcador de indiferenciación FA (EDAD 0 a 1 AÑOS)

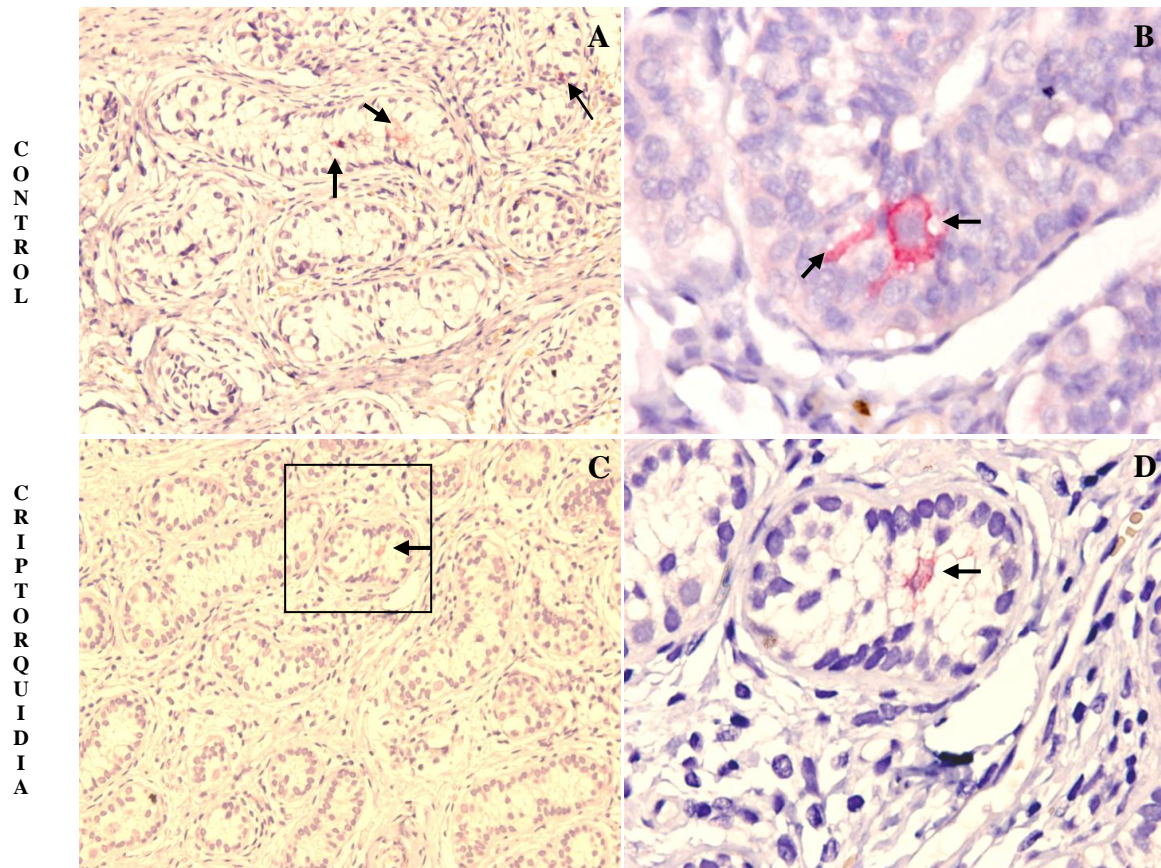


Figura 14: Inmunohistoquímica para FA de tejidos testiculares de 0 a 1 año de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad citoplasmática a FA. A y B) Tejido testicular de un niño control de 2 meses de edad, donde de manera normal se observa una reacción positiva al anticuerpo, en células ubicadas en el centro de los tubos seminíferos donde claramente se observan pseudópodos de la misma célula positivos, C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 1 año 6 meses, donde se observan células positivas en el centro de los tubos seminíferos. Las flechas indican las células positivas al anticuerpo y el cuadro señala la parte amplificada del tejido. Inmunohistoquímica, 20 y 60X respectivamente.

Tabla 4: Características particulares de pacientes positivos a OCT3/4, FA y c-Kit

Pacientes	Edad (años)	Tipo de criptorquidia	Tratamiento quirúrgico	Alteraciones histológicas	Marcadores		
					OCT3/4	FA	c-Kit
1	1	Bilateral abdominal	Biopsia y orquidopexia	Aplasia de células germinales y atrofia acentuada	0	1	
2	1	Unilateral derecha inguinal	Orquiectomía	Hipoplasia de células testiculares y ausencia de células neoplásicas.	2	2	2
3	1	Unilateral derecha abdominal	Orquiectomía	Fibrosis, atrofia leve y calcificaciones (microlitiasis)	1	1	1
4	2	Unilateral izquierda abdominal	Orquiectomía	Fibrosis y atrofia de túbulos seminíferos	1	0	
5	2	Bilateral derecha inguinal e izquierda abdominal	Orquiectomía	Hipoplasia celular	1	1	
6	2	Bilateral abdominal	Orquidopexia derecha Orquiectomía izquierda	Atrofia moderada y calcificaciones (microlitiasis)	3	3	3
7	5	Bilateral abdominal	Orquiectomía derecha Orquidopexia izquierda	Hipoplasia de células testiculares	0	1	
8	8	Unilateral derecha inguinal	Orquidopexia	Atrofia moderada	0	0	2
9	10	Unilateral izquierda inguinal	Biopsia y orquidopexia	Displasia leve	1	0	
10	15	Unilateral derecha inguinal	Biopsia y orquidopexia	Ausencia de espermatogénesis	0	1	
11	15	Unilateral derecha abdominal	Orquiectomía	Hipoplasia celular con fibrosis focal y detención de la maduración	3	3	3

Tabla 4: Se observan las características particulares de los pacientes que fueron positivos a los anticuerpos, se incluyen pacientes de tres grupos desde 1 hasta los 15 años de edad, se menciona el tipo de criptorquidia así como la ubicación de el o los testículos, el tratamiento quirúrgico que se le aplicó al paciente después del diagnóstico y las alteraciones histológicas observadas por el patólogo ya sea en el testículo completo o en la biopsia. También se observa la inmunoreactividad de cada anticuerpo OCT3/4, FA y c-Kit. En números rojos se señalan los pacientes que fueron positivos a los tres anticuerpos.

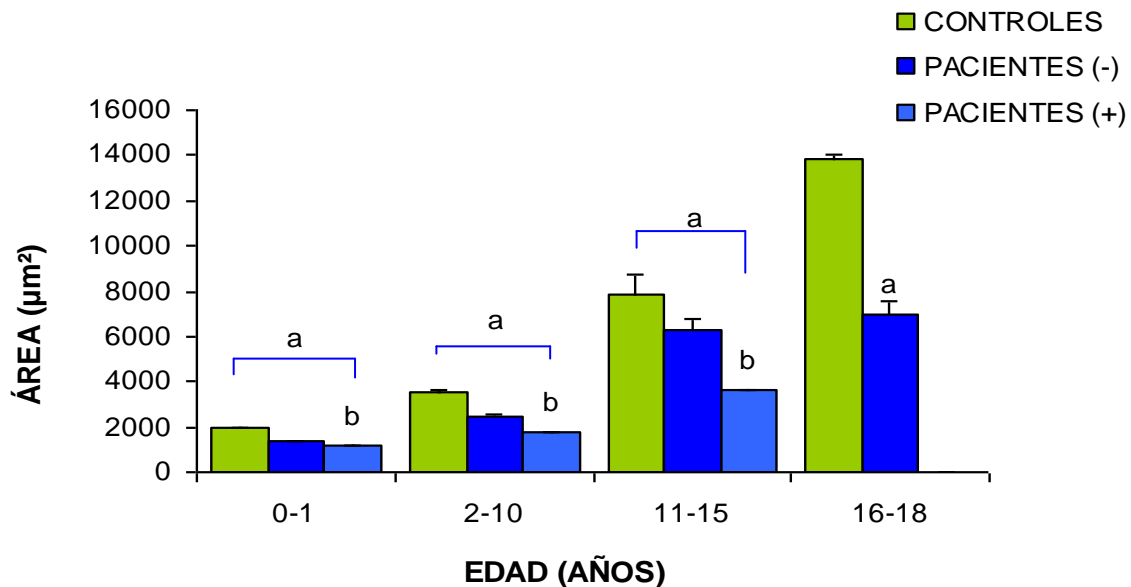


Morfometría

En la gráfica 1, se observa el área de los cordones/tubos seminíferos de pacientes controles y de forma general se observa un aumento en el área con respecto a la edad. Y en pacientes con criptorquidia, los cuales dividimos en dos grupos; pacientes con criptorquidia negativos y positivos a OCT3/4, C-Kit y FA, esto para correlacionar la morfometría con la inmunoreactividad, se observa una disminución significativa de nuestros pacientes criptorquidicos comparado con el grupo control, además de una disminución del área de los pacientes criptorquidicos positivos comparado con las áreas de los pacientes criptorquidicos negativos.

Al comparar el área de pacientes positivos con el área de pacientes negativos en el primer grupo de edad de 0 a 1 años de edad hubo una disminución significativa a una $p < 0.0115$.

Para el área de los cordones/tubos seminíferos de pacientes controles se calculó una media de 1954.18 ± 47.11 ; en los pacientes con criptorquidia positivos a marcadores de pluripotencialidad e indiferenciación se calculó una media de 1150.12 ± 6.21 y en los pacientes con criptorquidia negativos a dichas proteínas se calculó una media de 1340.50 ± 17.14 , además de que en las áreas de estos tejidos testiculares fueron 66% menores comparados con las áreas de tejidos controles.



Gráfica 1: Se observan las áreas del epitelio seminífero representadas como medias \pm el error estándar. ^a $p < 0.05$ al comparar pacientes control vs pacientes con criptorquidia y ^b $p < 0.05$ al comparar pacientes criptorquídicos negativos vs pacientes criptorquídicos positivos a proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación (prueba Mann-Whitney). En los cuatro grupos de edades, se observa una disminución significativa entre las áreas de los túbulos seminíferos de pacientes criptorquídicos comparado con las áreas de los tejidos testiculares de pacientes controles.

Histopatología

En el grupo control no se presentaron alteraciones, ya que se observaron cordones seminíferos con células de Sertoli distribuidas hacia la lámina basal, presencia de células mioides alrededor de los cordones seminíferos, además se localizaron algunas células germinales en los controles de 0 a 6 meses de edad que se ubicaron en su mayoría en el centro de los cordones seminíferos o cerca de la lámina basal. La membrana basal de los cordones seminíferos no se observó engrosada, el tejido intersticial fue normal, no se identificó fibrosis ni hipoplasia de células de Leydig, se observaron vasos sanguíneos en el intersticio, ausencia de células atípicas, fibrosis y descamación dentro y fuera de los cordones seminíferos (figura 15A, B).

A diferencia del grupo control, en los tejidos testiculares de pacientes se observaron diferentes alteraciones características de los pacientes con criptorquidia (figura 15C, D), como microlitiasis, aumento de grosor de la membrana basal e hipoplasia de células testiculares dentro de los tubos seminíferos, además se observó fibrosis y a consecuencia de esto se observó hipoplasia de células de Leydig y pocos vasos sanguíneos.

Alteraciones en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia de 0 a 1 año de edad

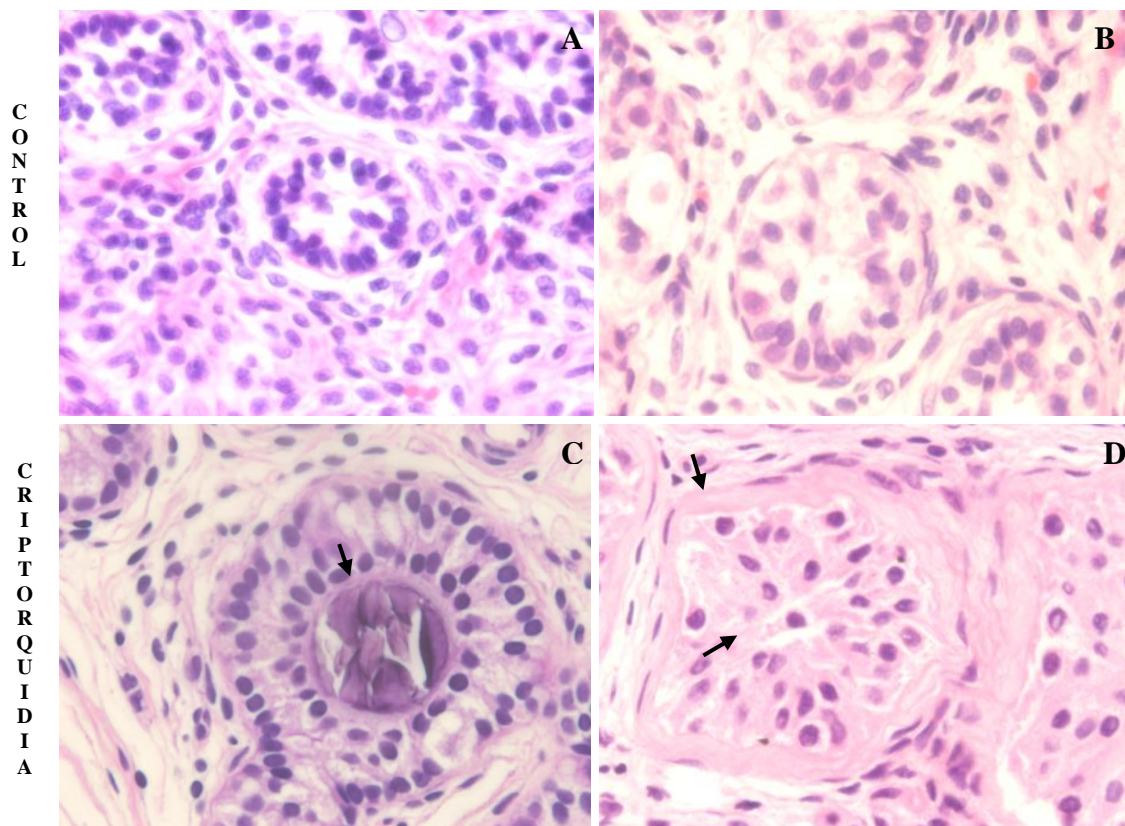


Figura 15: Tejidos testiculares de niños de 0 a 1 años de edad A, B) cordones seminíferos de un niño control que presenta forma y tamaño normal, presencia de células de Sertoli y ausencia de células atípicas, membrana basal sin invaginaciones e intersticio con células de Leydig y sin alteraciones. En el grupo de pacientes con criptorquidia se observan las principales alteraciones testiculares, C) microcalcificaciones o microlitiasis (flecha), D) engrosamiento de la membrana basal (flecha), fibrosis, descamación celular dentro del cordón e hipoplasia de células de Sertoli (flecha). H&E, 60X.

7.2 Grupo de 2 a 10 años de edad

Inmunoreactividad

OCT3/4

La inmunoreactividad fue de 0 en los 7 niños control estudiados y en los pacientes con criptorquidia se presentó de 1.4 ± 0.24 en 5 de 25 pacientes (tabla 3). Los cuatro pacientes con mayor inmunoreactividad fueron el *paciente número 6* de 2 años de edad, con un valor de inmunoreactividad igual a 3, el *paciente número 4* de 2 años de edad con un valor de inmunoreactividad igual a 1, el *paciente número 5* de 2 años de edad, con una inmunoreactividad igual a 1 y el *paciente número 9* de 10 años de edad, con un valor de inmunoreactividad igual a 1 (tabla 4) los cuales se describen a continuación.

Paciente número 6. Este paciente fue diagnosticado con criptorquidia bilateral abdominal, recibió un tratamiento quirúrgico realizándole orquidopexia del testículo derecho y orquiectomía del testículo izquierdo con un diagnóstico histopatológico de atrofia moderada y microlitiasis. El *paciente número 4*, este paciente fue diagnosticado con criptorquidia unilateral izquierda abdominal, se le realizó un tratamiento quirúrgico de orquiectomía izquierda y el diagnóstico histopatológico fue fibrosis y atrofia de túbulos seminíferos. El *paciente número 5*, fue diagnosticado con criptorquidia bilateral derecha inguinal e izquierda abdominal, el tratamiento quirúrgico que recibió fue orquiectomía de ambos testículos y el diagnóstico histopatológico fue hipoplasia celular. Y el *paciente número 9*, diagnosticado con criptorquidia unilateral izquierda inguinal, el tratamiento quirúrgico fue la realización de una biopsia del testículo izquierdo y posteriormente una orquidopexia y el diagnóstico histopatológico fue displasia leve testicular.

En la figura 16A y B se observa el tejido testicular de un niño control de 2 años de edad, en el cual la expresión de OCT3/4 fue nula y en el tejido

testicular del paciente de 2 años 5 meses de edad (figura 16C y D), se identifican células germinales positivas, la reacción nuclear positiva se observó en células que se ubicaron en el centro y en cercanas a la membrana basal de los tubos seminíferos y debido a la morfología característica se podrían identificar como gonocitos.

Marcador de pluripotencialidad OCT3/4(EDAD 2 a10 AÑOS)

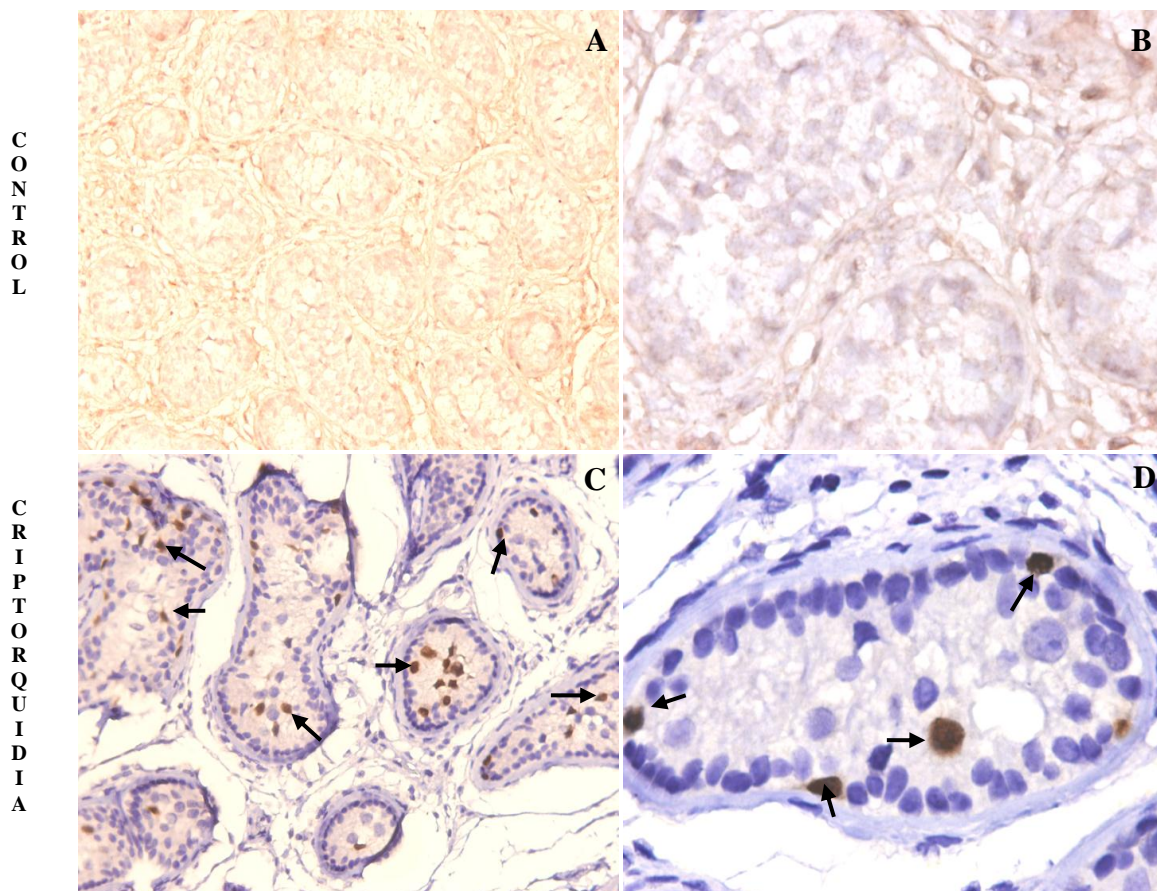


Figura 16: Inmunohistoquímica para OCT3/4 de tejidos testiculares de 2 a 10 años en donde se observa una clara inmunoreactividad nuclear a OCT3/4. A y B) Tejido testicular de un niño control de 2 años de edad, en donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva. C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 2 años 5 meses, donde se observan células positivas en el centro y periferia del tubo seminífero. Las flechas señalan las células positivas al anticuerpo. Inmunohistoquímica, 20 y 60X respectivamente.



c-Kit

En este grupo la inmunoreacción fue de 0 en los 7 niños control estudiados y aumentó a 3 en 2 de 25 pacientes analizados (tabla 3). Los dos pacientes con mayor inmunoreactividad fueron, el *paciente número 6* con 2 años de edad, con una inmunoreactividad de 5, el cual ya fue descrito anteriormente y el *paciente número 8* de 8 años de edad, con una inmunoreactividad igual a 2, (tabla 4) este paciente fue diagnosticado con criptorquidia unilateral derecha inguinal, se le realizó un tratamiento quirúrgico de orquidopexia y el diagnóstico histopatológico fue de atrofia testicular moderada.

En la figura 17A y B, se observa un tejido testicular de un niño control de 2 años de edad, en el que de manera normal hay una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva a éste. La reacción a c-Kit se observó en el citoplasma de células en pacientes de 2 a los 10 años de edad, en la figura 17C y D, se identificó un tejido testicular de un paciente de 2 años 5 meses de edad, en donde hay positividad a células ubicadas en el centro y periferia de los túbulos seminíferos. Debido a que estas células positivas, son células grandes, pálidas y con núcleos redondos prominentes, además de que se ubican en el centro del tubo seminífero se podrían identificar fácilmente como gonocitos.

Marcador de pluripotencialidad c-Kit (EDAD 2 a 10 AÑOS)

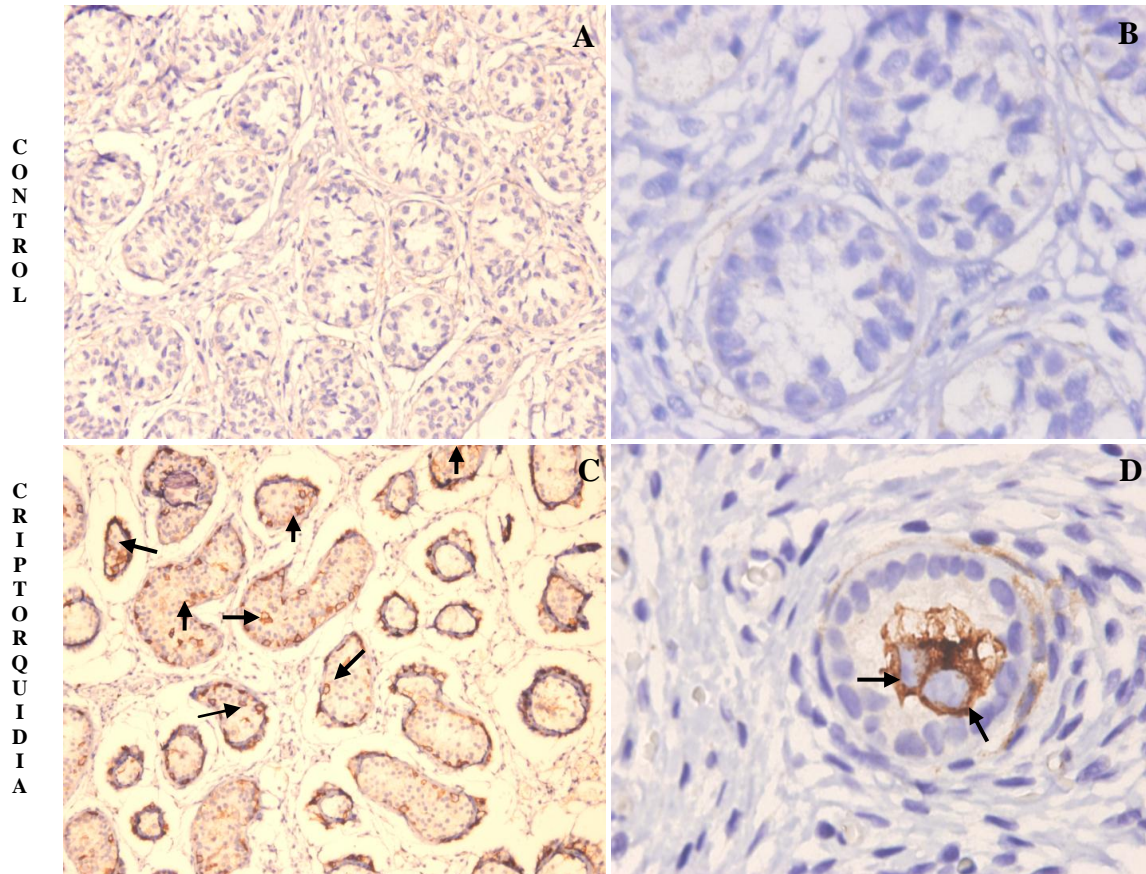


Figura 17: Inmunohistoquímica para c-Kit de tejidos testiculares de 2 a 10 años de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad citoplasmática a c-Kit. A y B) Tejido testicular de un niño control de 2 años, donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva, C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 2 años 5 meses, en donde se observan células positivas en el centro y periferia de los tubos seminíferos. Las flechas indican las células positivas al anticuerpo. Inmunohistoquímica, 20 y 60X respectivamente.



FA

En el grupo control, FA tuvo una inmunoreactividad igual a 0 en los 7 tejidos testiculares de los niños control. En los pacientes el valor medio de inmunoreactividad aumentó a 1.66 ± 0.33 en 3 tejidos de un total de 25 (tabla 3). Los tres pacientes con mayor inmunoreactividad (tabla 4) serán descritos a continuación.

El *paciente número 6 y 5* de 2 años de edad, con una inmunoreactividad de 3 y 1 respectivamente, de los cuales dichas características ya fueron mencionadas anteriormente y el *paciente número 7* de 5 años de edad, con una inmunoreactividad de 1. Este paciente fue diagnosticado con criptorquidia bilateral abdominal, recibió un tratamiento quirúrgico de orquiectomía del testículo derecho y orquidopexia del testículo izquierdo y el diagnóstico histopatológico del testículo derecho fue de células testiculares sin alteraciones.

En la figura 18A y B, se observó un tejido testicular de un niño control de 2 años de edad donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se detecta ninguna célula positiva. La reacción de FA se observó en tejidos testiculares de pacientes de este grupo de 2 a 10 años de edad. En la figura 18C y D, se observó un tejido testicular de un paciente, donde se identificaron células positivas en el centro y periferia de los tubos seminíferos.

Marcador de indiferenciación FA (EDAD 2 a 10 AÑOS)

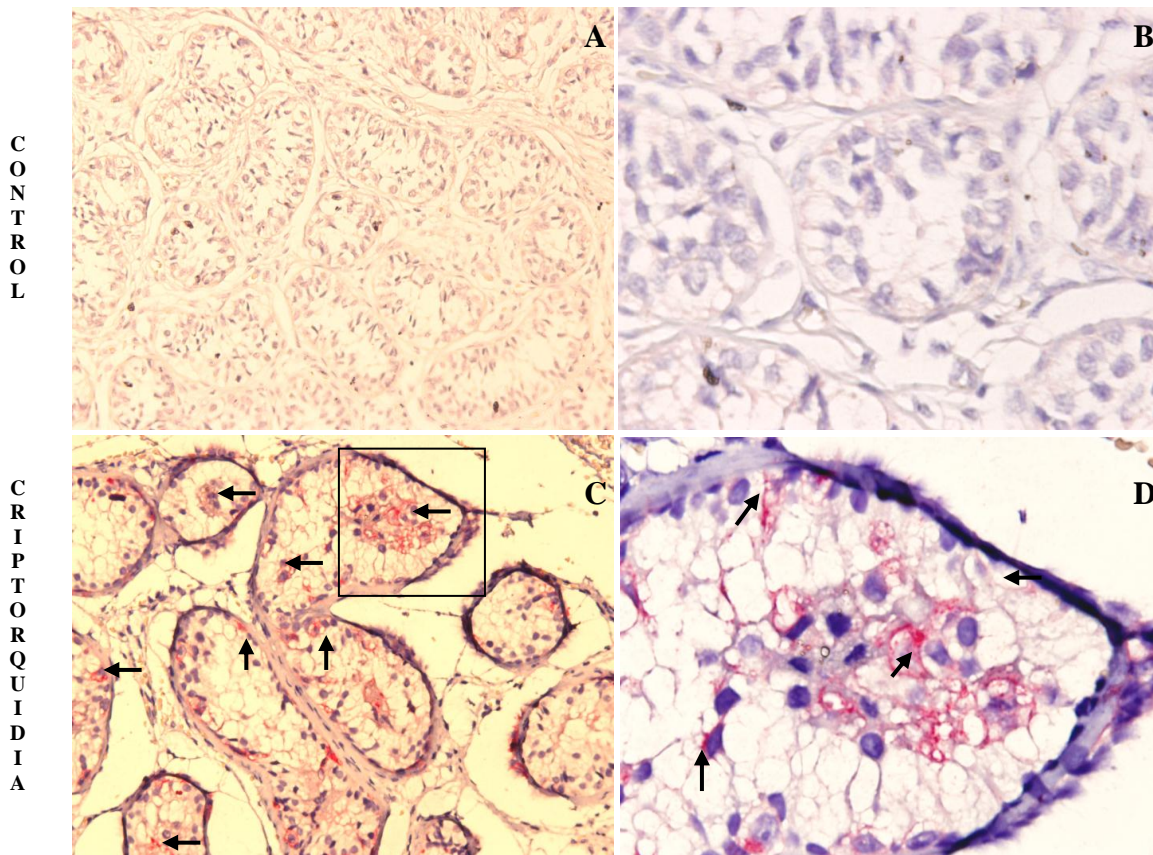


Figura 18: Inmunohistoquímica para FA de tejidos testiculares de 2 a 10 años de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad citoplasmática a FA. A y B) Tejido testicular de un niño control de 2 años, donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 2 años 5 meses, donde se observan células positivas en el centro y periferia de los tubos seminíferos. Las flechas indican las células positivas y el cuadro señala la parte ampliada del tejido. Inmunohistoquímica, 20 y 60X respectivamente.

Morfometría

En las áreas de los tubos seminíferos de pacientes controles se calculó una media de 3510.80 ± 97.06 ; para los pacientes criptorquidicos positivos a proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación se calculó un área de 1722.26 ± 13.68 y para los pacientes con criptorquidia negativos a dichas proteínas se calculó un área de 2444.61 ± 33.53 . Las áreas de los pacientes criptorquidicos se vieron comprometidas a las alteraciones presentes en dichos tejidos, ya que también en este grupo se observó una disminución del 66% en comparación



con los tejidos testiculares de pacientes control e igual que en el grupo anterior de 0 a 1 año de edad (gráfica 1).

Histopatología

En la figura 19A y B se observan tejidos testiculares de niños control, se identifican células testiculares en cantidad y distribución normal, membrana basal sin engrosamiento y con células mioides, intersticio sin fibrosis y con vasos sanguíneos y en algunos tubos se observa la presencia de luz tubular en proceso. En la figura 19C y D se observan tejidos testiculares de pacientes, en los que se identificaron alteraciones como microlitiasis, el intersticio no presentó alteraciones evidentes, pero dentro de los tubos seminíferos se localizaron células atípicas que se caracterizaron por ser células que morfológicamente eran diferentes a las células que normalmente se presentan en los controles, estas células fueron grandes, pálidas, con núcleos grandes, basófilas y que además su posición dentro del cordón o tubo seminífero fue central o hacia la lámina basal indefinidamente.

Alteraciones en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia de 2 a 10 años de edad

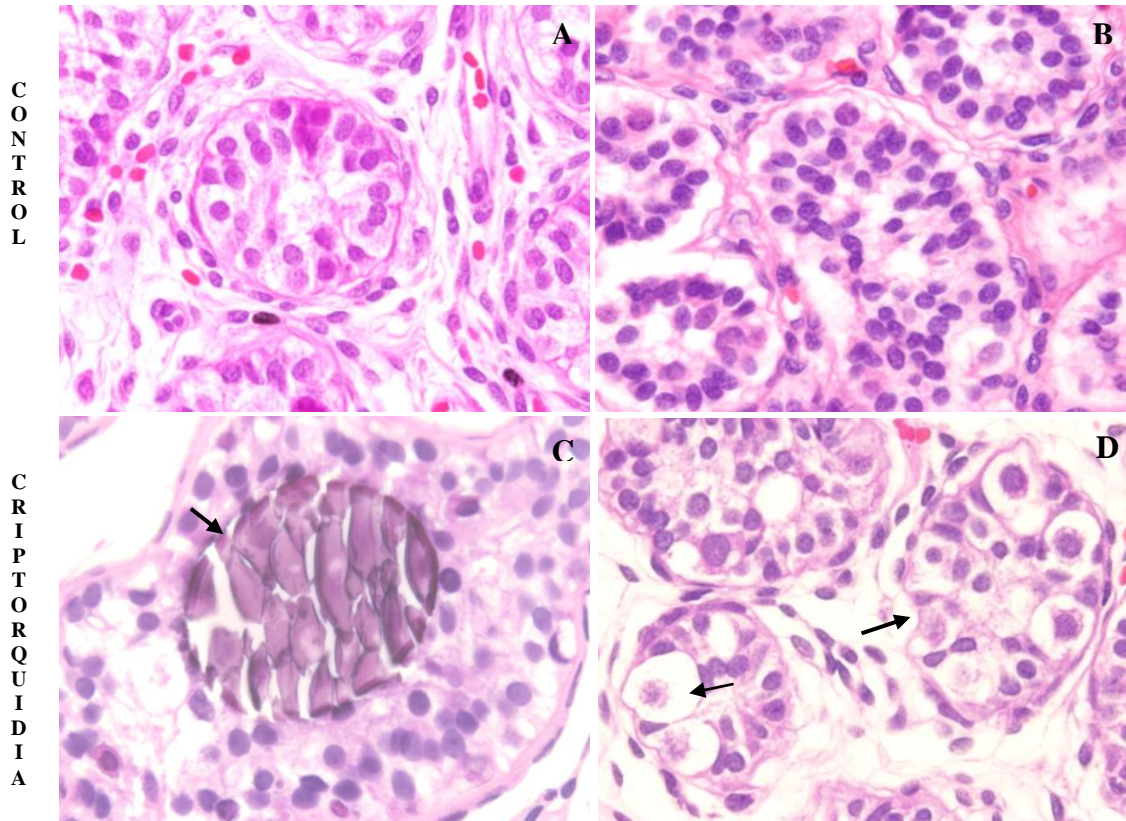


Figura 19: Tejidos testiculares de niños de 2 a 10 años de edad A, B) cordones seminíferos de un niño control que presenta forma y tamaño normal, presencia de células de Sertoli y ausencia de células atípicas, membrana basal sin alteraciones e intersticio con células de Leydig y sin fibrosis. En el grupo de pacientes con criptorquidia se observan las principales alteraciones de tejidos testiculares, C) se observa microlitiasis en el centro del tubo seminífero, D) presencia de células atípicas, tubos pequeños con invaginaciones de membrana las flechas indican las lesiones en el tejido. H&E, 60X.



7.3 Grupo de 11 a 15 años de edad

Inmunoreactividad

OCT3/4

La inmunoreactividad en niños control para OCT3/4 fue de 0 en 3 niños estudiados y aumentó a 2 en 2 pacientes con criptorquidia de un total de 7 (tabla 3). El paciente con mayor inmunoreactividad fue el *paciente número 11* el cual se describe a continuación.

Paciente número 11 de 15 años de edad, con un valor de inmunoreactividad igual a 3. Este paciente fue diagnosticado con criptorquidia unilateral derecha abdominal, el tratamiento quirúrgico que recibió fue orquiectomía y el diagnóstico histopatológico fue hipoplasia celular con fibrosis focal y detención de la maduración (tabla 4).

La reacción de OCT3/4 estuvo presente en tejidos testiculares de este grupo de 11 a 15 años de edad, en donde se presentó una clara inmunoreactividad nuclear. En la figura 20A y B, de manera normal se identificó una reacción negativa al anticuerpo, no se observaron células positivas. Sin embargo en los pacientes, si hubo células positivas y éstas se ubicaron en el centro o hacia la membrana basal de los tubos seminíferos (figura 20C y D). Es importante señalar que la inmunoreacción positiva a esta proteína, podría ser característica del CIST, por lo que los pacientes que presentaron positividad a OCT3/4 y con mayor razón los que también presentaron positividad para c-Kit y FA; podrían ser diagnosticados con CIST.

Marcador de pluripotencialidad OCT3/4(EDAD 11 a 15 AÑOS)

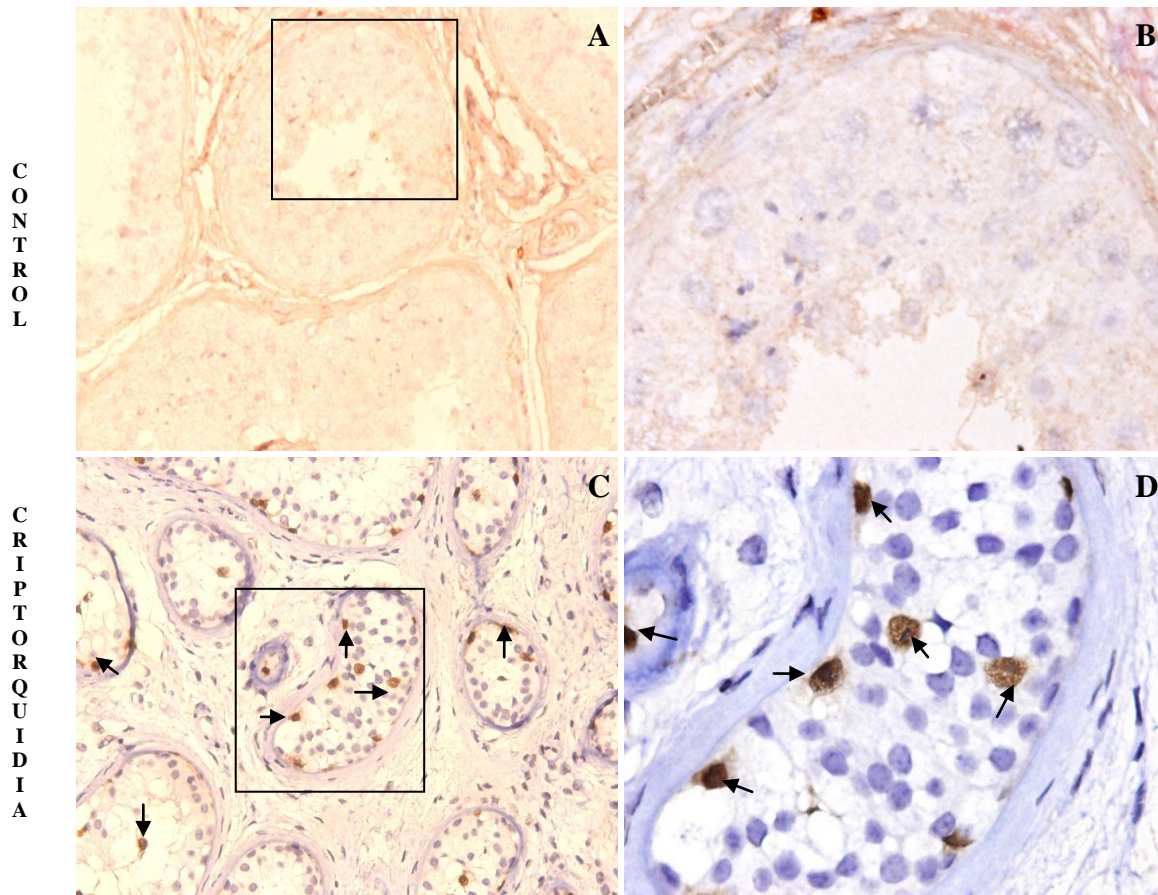


Figura 20: Inmunohistoquímica para OCT3/4 de tejidos testiculares de 11 a 15 años de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad nuclear a OCT3/4. A y B) Tejido testicular de un niño control de 15 años, donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva, C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 15 años de edad, donde se observan células positivas en el centro y periferia de los túbulos seminíferos. Las flechas indican las células positivas al anticuerpo y el cuadro señala la parte amplificada del tejido. Inmunohistoquímica 20 y 60X respectivamente.

c-Kit

La inmunoreactividad en niños control para c-Kit fue de 0 en 3 niños estudiados pero en los pacientes con criptorquidia la inmunoreacción fue de 3 en un tejido de los 7 estudiados. El paciente que fue positivo en este caso fue el *paciente número 11* de 15 años de edad, cuyas características ya fueron mencionadas anteriormente.

La reacción para c-Kit fue nula en tejidos testiculares de los niños control (figura 21A y B) y en los pacientes (figura 21C y D) si se identificaron células positivas que se ubicaron en el centro y hacia la membrana basal de los tubos seminíferos. Las células que se ubicaron en el centro de los tubos, fueron células con núcleos grandes y pálidos que podrían ser identificadas como gonocitos, además de que la expresión citoplasmática del c-Kit también hace referencia a que las células podrían ser diagnosticadas como células del CIST.

Marcador de pluripotencialidad c-Kit (EDAD 11 a 15 AÑOS)

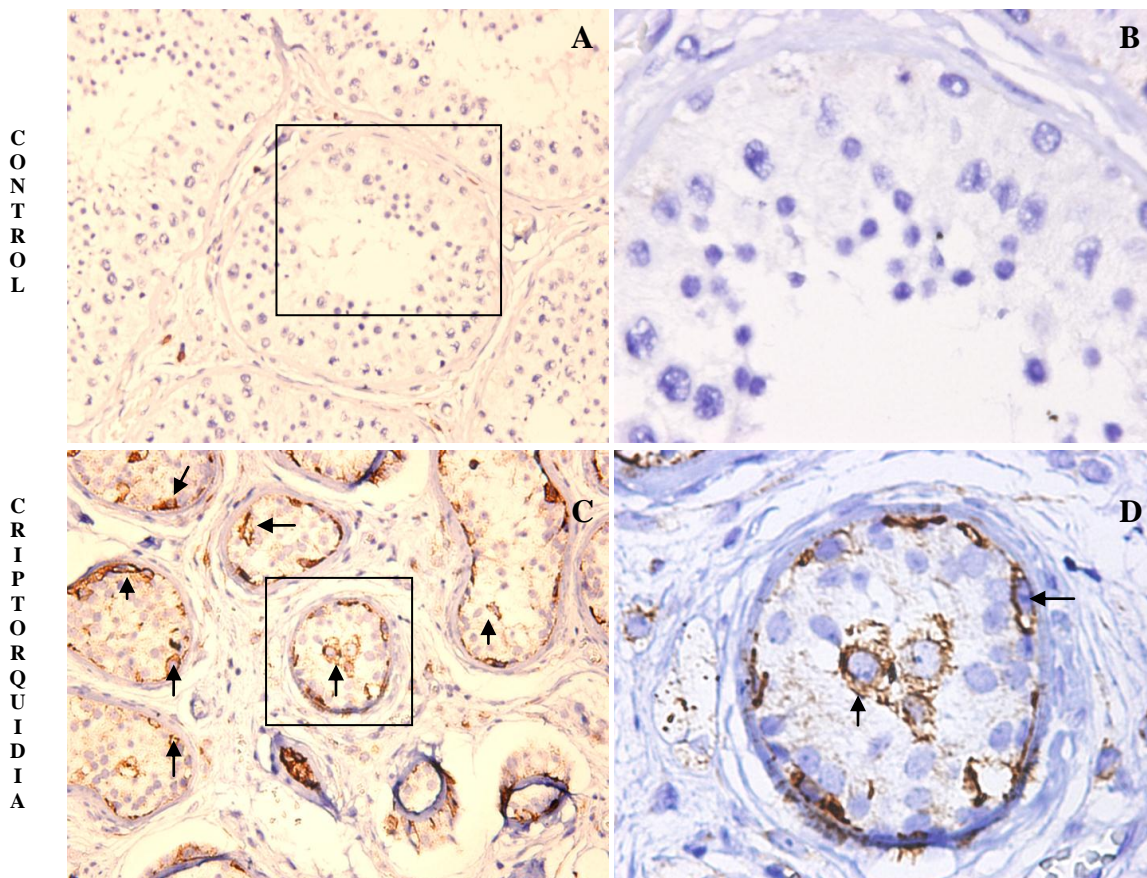


Figura 21: Inmunohistoquímica para c-Kit de tejidos testiculares de 11 a 15 años de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad citoplasmática a c-Kit. A y B) Tejido testicular de un niño control de 15 años, donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva, C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 15 años de edad, donde se observan células positivas en el centro y periferia de los tubos seminíferos. Las flecha indican las células positivas al anticuerpo y los cuadros indican la parte ampliada del tejido. Inmunohistoquímica, 20 y 60X respectivamente.



FA

En este grupo la inmunoreactividad media fue de 0 en 3 tejidos controles analizados y en los pacientes con criptorquidia aumentó a 2 en 2 tejidos de un total de 7 (tabla 3). En este caso los dos pacientes positivos fueron: el *paciente número 10* de 15 años de edad con una inmunoreactividad de 1, el cual se describe a continuación. Y el *paciente número 11* de 15 años de edad, con una inmunoreactividad más alta, de 3 cuyas características ya fueron mencionadas anteriormente (tabla 4).

Paciente número 10, este paciente fue diagnosticado con criptorquidia unilateral derecha inguinal, el tratamiento quirúrgico que se le realizó fue una biopsia en el testículo derecho y posteriormente una orquidopexia, el diagnóstico histopatológico para dicha biopsia fue ausencia de espermatogénesis.

En la figura 22A y B se observa que en el grupo de niños control, hay una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva en el tejido testicular. En los pacientes se identifican células positivas a FA (figura 22C y D), estas células podrían ser identificadas como gonocitos debido a que en algunas se puede observar los pseudópodos positivos de las células que permiten la migración hacia la membrana basal para diferenciarse a espermatogonia, además de que estas células son grandes con núcleos prominentes y pálidas. Sin embargo a esta edad la migración y diferenciación del gonocito debería haberse completado por lo que estas células podrían ser mejor diagnosticadas como células del CIS_t, además porque FA suele ser el principal marcador de diagnóstico para dicha patología.

Cabe mencionar que las alteraciones histológicas encontradas en los pacientes se observaron en todo el tejido en general y los tejidos de pacientes y niños controles que fueron positivos ya sea a OCT3/4, c-Kit o FA la reacción

observada fue exclusiva de ciertas zonas en el tejido, no todos los tubos seminíferos presentaban células positivas.

Marcador de indiferenciación FA (EDAD 11 a 15 AÑOS)

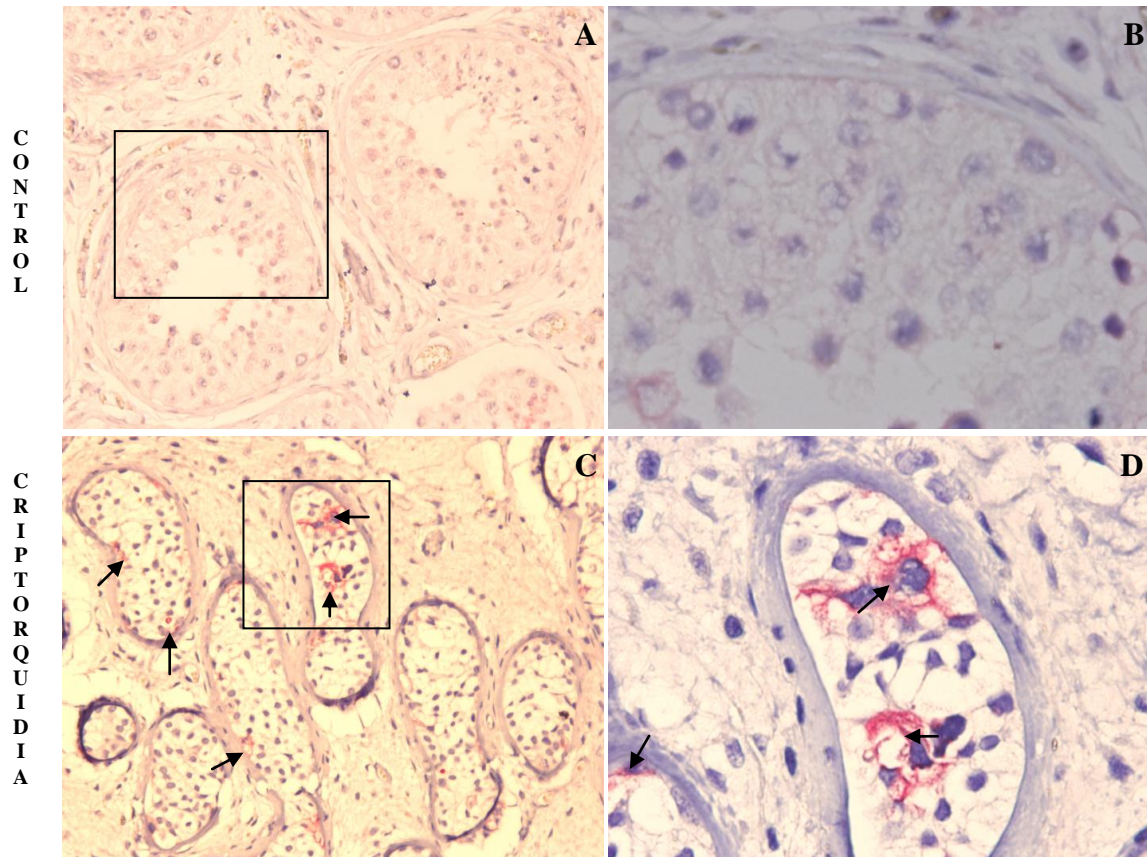


Figura 22: Inmunohistoquímica para FA de tejidos testiculares de 11 a 15 años de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad citoplasmática a FA. A y B) Tejido testicular de un niño control de 15 años de edad, donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 15 años de edad, donde se observan células positivas en el centro y periferia de los tubos seminíferos. Las flechas señalan las células positivas al anticuerpo y los cuadros indican la zona ampliada del tejido. Inmunohistoquímica, 20 y 60X respectivamente.



Morfometría

Se calculó una media promedio para las áreas de pacientes controles de 7873.87 ± 876.48 ; para los pacientes criptorquídicos positivos a las proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación, la media calculada fue de 3625.61 ± 30.21 y para los pacientes negativos a dichas proteínas se calculó una media de 6299.37 ± 276.45 . Las áreas de los tubos seminíferos de este grupo de pacientes criptorquídicos también disminuyó debido a las alteraciones presentes en dichos tejidos, la disminución fue de 78.49% menor que en los grupos anteriores, pero comparada con el grupo de niños control si hubo disminución (gráfica 1).

Histopatología

En la figura 23A y B, se identifica un tejido testicular de un niño control, en el que se observan tubos seminíferos con desarrollo normal de la espermatogénesis, membrana basal sin alteraciones, intersticio con presencia de células de Leydig y presencia de vasos sanguíneos. A diferencia de los pacientes (figura 23C y D) en los cuales hay daños más evidentes que logramos identificar, principalmente la detención o ausencia definitiva de la espermatogénesis esto debido a la hipoplasia o aplasia de células de Sertoli, espermatogonias y células de Leydig generalmente, en su lugar se observaron células que morfológicamente se identifican como atípicas. Además de que a causa de la hipoplasia de células testiculares se presentó una disminución en el diámetro de los tubos seminíferos, en algunos tubos hubo engrosamiento de la membrana basal y disminución de células mioides, el intersticio presentó en su mayoría fibrosis, lo que provocó disminución de vasos sanguíneos y pérdida de células de Leydig.

Alteraciones en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia de 11 a 15 años de edad

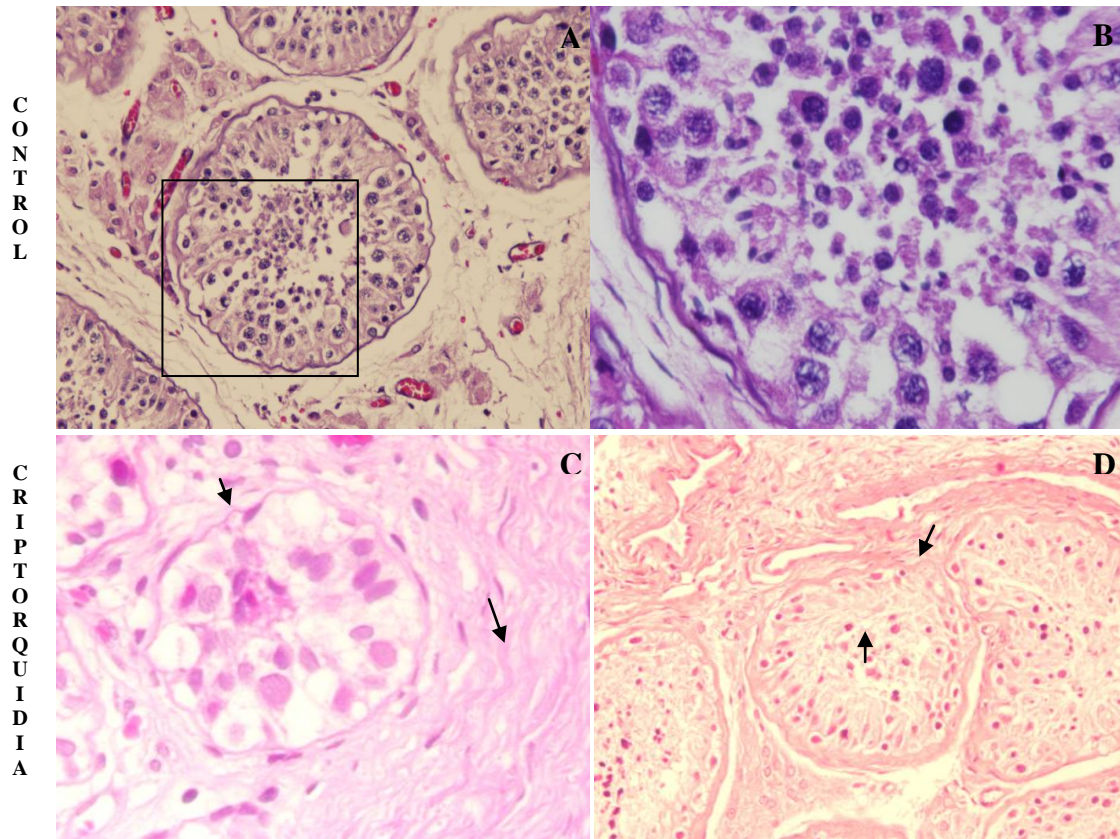


Figura 23: Tejidos testiculares de niños de 11 a 15 años de edad A, B) cordones seminíferos de un niño control que presenta forma y tamaño normal, membrana basal sin alteraciones, presencia de células de Sertoli y ausencia de células atípicas, intersticio con células de Leydig y sin fibrosis. En el grupo de pacientes con criptorquidia, se observan las principales alteraciones de tejidos testiculares, C) se observa hipoplasia de células dentro de los tubos seminíferos, ausencia de espermatogénesis, aumento de tejido conjuntivo en el intersticio, D) ausencia de espermatogénesis y engrosamiento de la membrana basal. Las flechas indican las lesiones y el cuadro indica la zona amplificada del tejido. H&E, 60X.



7.4 Grupo de 16 a 18 años de edad

Inmunoreactividad

OCT3/4

En los 8 niños control el valor de la inmunoreactividad para OCT3/4 fue de 0 y en los pacientes con criptorquidia también fue de 0 en los 4 pacientes tratados (tabla 3). En los tejidos testiculares tanto de niños control y de pacientes la reacción fue negativa, no se observaron células positivas a esta proteína (figura 24A, B, C y D).

c-Kit

En el grupo de niños control la inmunoreacción a c-Kit fue 0 en los 8 niños estudiados de igual manera en los 4 pacientes utilizados la inmunoreacción a c-Kit fue igual a 0.

En los tejidos testiculares tanto de niños control y de pacientes la reacción fue negativa, no se observaron células positivas a este marcador (figura 25A, B C y D).

Marcador de pluripotencialidad OCT3/4(EDAD 16 a 18 AÑOS)

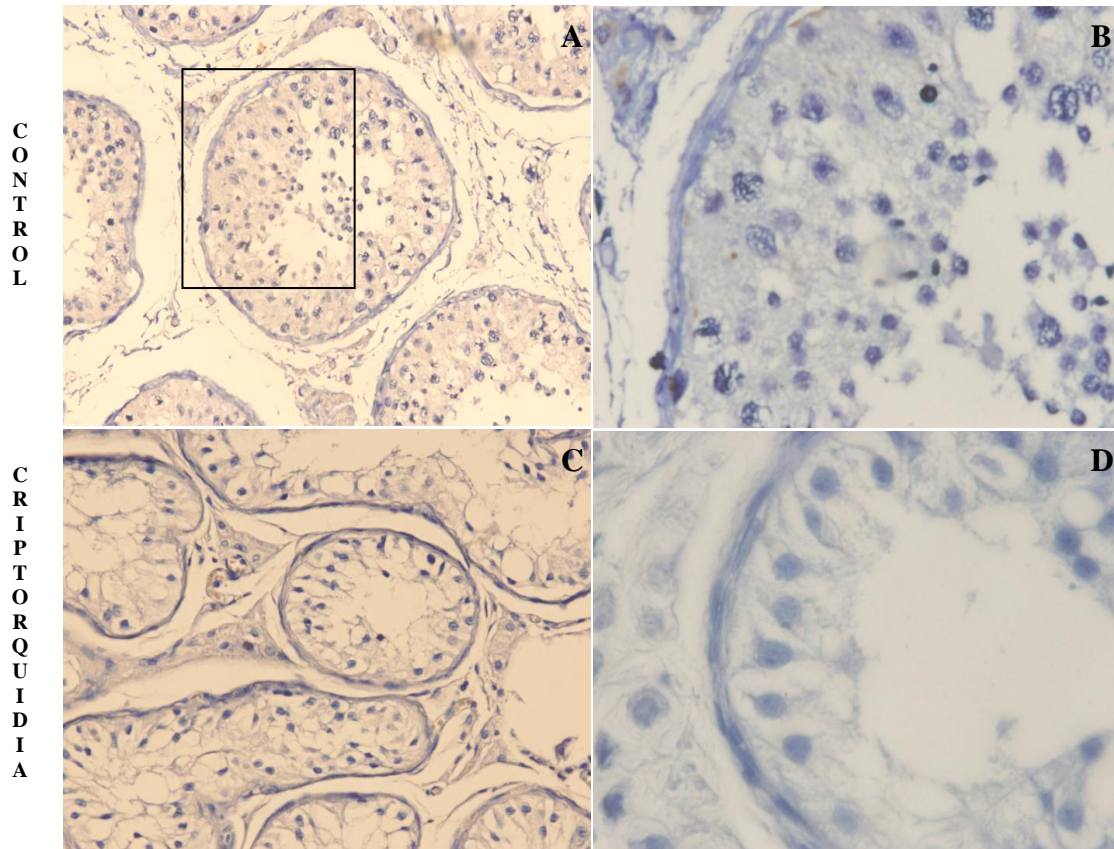


Figura 24: Inmunohistoquímica para OCT3/4 de tejidos testiculares de 16 a 18 años de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad negativa a OCT3/4. A y B) Tejido testicular de un niño control de 17 años, donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva, C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 16 años de edad, donde se observan células negativas al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva. El cuadro señala la parte ampliada del tejido. Inmunohistoquímica 20 y 60X respectivamente.

Marcador de pluripotencialidad c-Kit (EDAD 16 a 18 AÑOS)

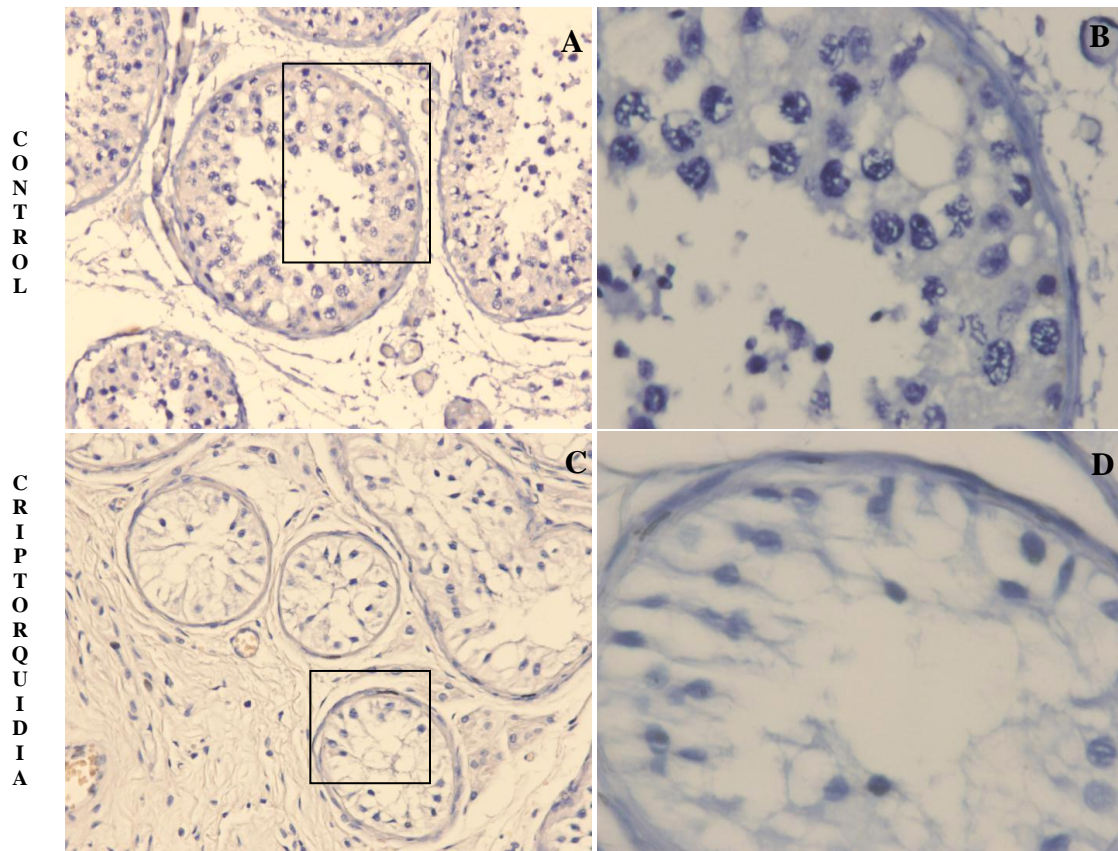


Figura 25: Inmunohistoquímica para c-Kit de tejidos testiculares de 16 a 18 años de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad negativa a c-Kit. A y B) Tejido testicular de un niño control de 17 años, donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva, C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 16 años de edad, donde no se observan células positivas en todo el tejido. Los cuadros indican la parte ampliada del tejido. Inmunohistoquímica, 20 y 60X respectivamente.

FA

En los 8 niños control la inmunoreactividad fue de 0, igual que en los 4 pacientes de este grupo el valor de inmunoreactividad fue de 0 (tabla 3), no se observaron células positivas ni en pacientes control ni en pacientes con criptorquidia (figura 26).

Es importante mencionar que en el paciente 11 de 15 años de edad, se observó una co-localización (figura 28A y B) a c-Kit y FA. Sin embargo en otros

tejidos de pacientes con criptorquidia también se pudo comprobar esta co-localización.

Marcador de indiferenciación FA (EDAD 16 a 18 AÑOS)

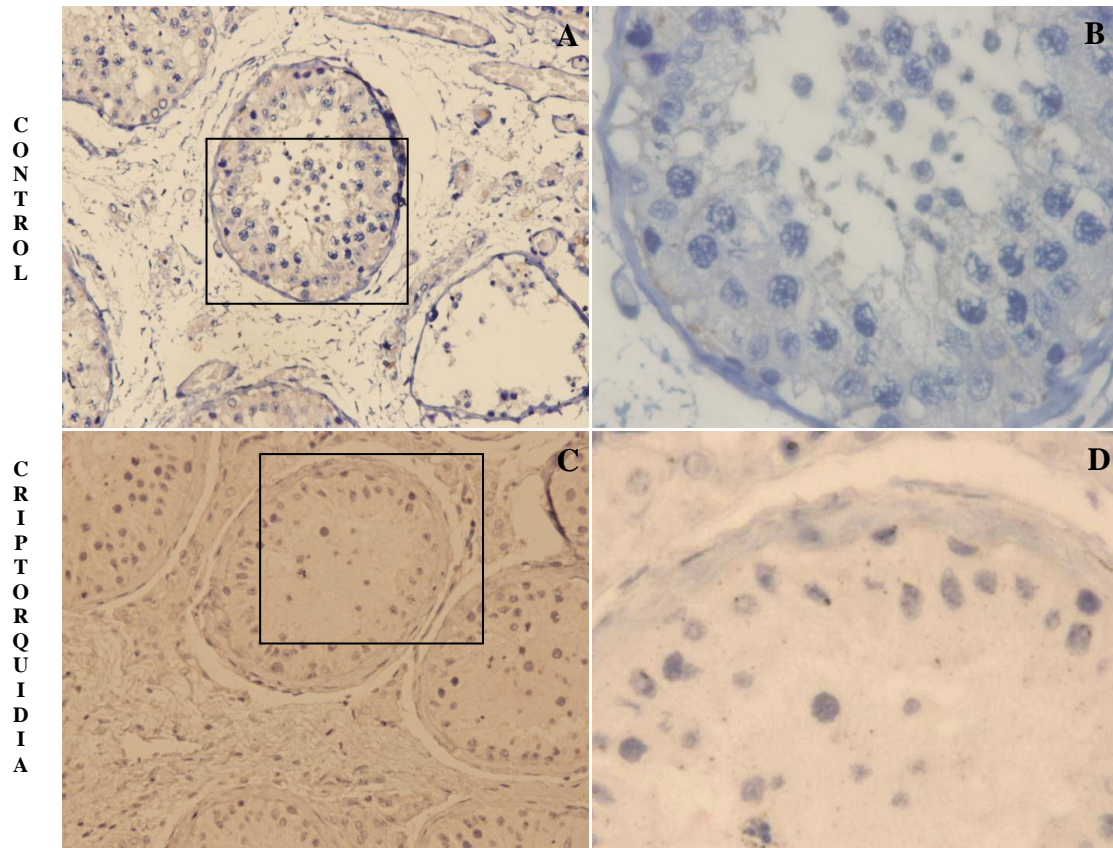


Figura 26: Inmunohistoquímica para FA de tejidos testiculares de 16 a 18 años de edad, en donde se observa una clara inmunoreactividad citoplasmática a FA. A y B) Tejido testicular de un niño control de 17 años de edad, donde de manera normal se observa una reacción negativa al anticuerpo, no se observa ninguna célula positiva C y D) Tejido testicular de un paciente con criptorquidia de 18 años de edad, donde se observan células negativas en los tubos seminíferos. Los cuadros indican la zona ampliada del tejido. Inmunohistoquímica, 20 y 60X respectivamente.

Morfometría

En estos pacientes controles la media calculada para las áreas fue de 13876.85 ± 438.19 ; para los pacientes con criptorquidia negativos a las proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación la media calculada fue de 6951.06 ± 321.60 , por lo que la disminución de las áreas fue más evidente ya que se observaron pocas células dentro de los tubos seminíferos, lo que



provocó una disminución del 72% comparado con los tejidos de los niños control (gráfica 1).

Histopatología

En el grupo de pacientes control, se observa un desarrollo normal del tejido testicular, ya que se identifican células testiculares con un mejor desarrollo (fig.27A y B), con una espermatogénesis completa y el intersticio presenta células de Leydig y vasos sanguíneos.

En los pacientes con criptorquidia (figura 27C y D) como en el grupo anterior las alteraciones morfológicas en el tejido testicular se pudieron observar con mayor severidad desde los 11 años y en este grupo de 16 a 18 años se observó algo similar, ya que el desarrollo de la espermatogénesis se vio comprometida a las alteraciones en el tejido, se observaron pocas células de Sertoli y espermatogonias dentro de los tubos seminíferos, la membrana basal se veía engrosada y el intersticio presentó fibrosis lo que disminuyó los vasos sanguíneos y las células de Leydig.

Alteraciones en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia de 16 a 18 años de edad

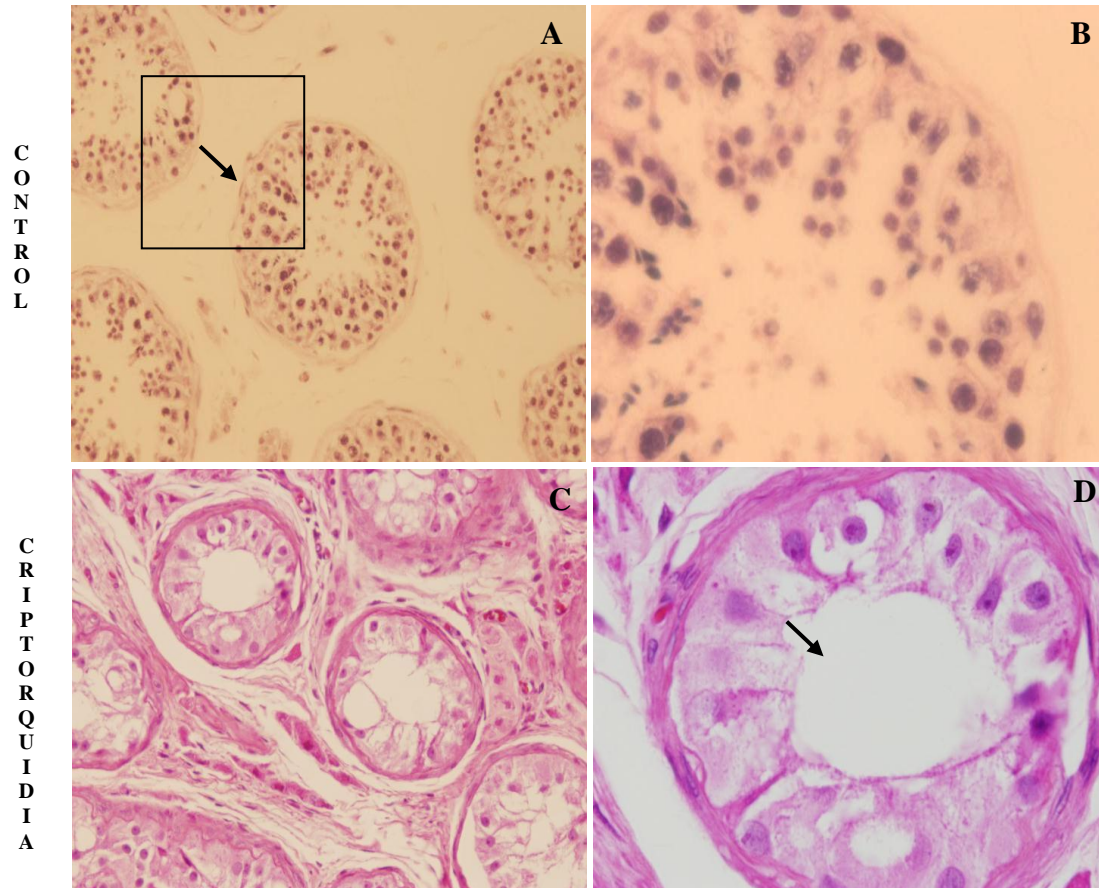


Figura 27: Tejidos testiculares de niños de 16 a 18 años de edad A, B) cordones seminíferos de un niño control que presenta forma y tamaño normal, membrana basal sin alteraciones, presencia de células de Sertoli y ausencia de células atípicas, intersticio con células de Leydig y sin fibrosis. En el grupo de pacientes con criptorquidia se observan las principales alteraciones de tejidos testiculares, C) se observa hipoplasia de células testiculares dentro de los tubos seminíferos y ausencia de espermatogénesis, D) ausencia de espermatogénesis y hipoplasia de células testiculares. Las flechas indican las lesiones y el cuadro indica la zona ampliada del tejido. H&E, 20 y 60X.

CORRELACIÓN DE POSITIVIDAD

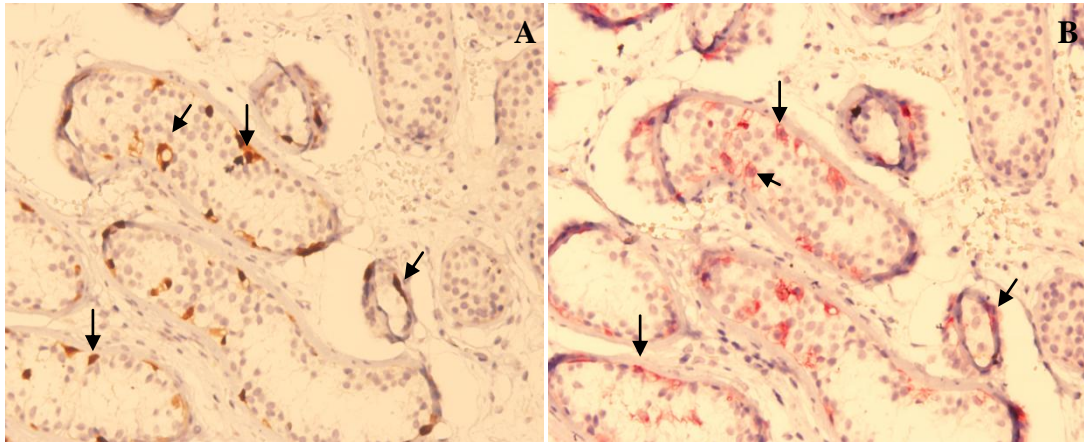


Figura 28: Tejido testicular de un paciente de 15 años de edad, donde se observa que las mismas células que son positivas a c-Kit (A) también lo son para FA (B). Técnica de Inmunohistoquímica, 60X.



8. DISCUSIÓN

La criptorquidia, es al nacimiento la falla congénita más frecuente en el ser humano y es el factor de riesgo mejor documentado en neoplasia testicular, ya que incrementa, de 7 a 10 veces, el riesgo de desarrollar un seminoma. Aunque esta asociación es establecida, no se conocen los mecanismos que conducen a esta malignidad. Se ha propuesto al gonocito como el responsable del desarrollo del seminoma, y se sugiere que este tipo celular se mantiene indiferenciado en los pacientes con criptorquidia. El estado indiferenciado puede mantenerse por varias razones, entre ellas la persistencia de proteínas de sobrevivencia de células pluripotenciales (OCT3/4, NANOG, c-Kit, AP2γ y FA) que inducen el desarrollo del CISt, considerado el precursor del seminoma.

Las alteraciones histológicas testiculares determinadas en los pacientes con criptorquidia reafirman algunos resultados previos en otras poblaciones diferentes a la nuestra. Fue claro que el testículo de nuestros pacientes tiene cambios histológicos en el epitelio germinal, que dependiendo de su localización (mayor en los intra-abdominales) y de la edad a la que se realice el tratamiento (orquidopexia-orquiectomía) fue la severidad del daño. Siete de nuestros pacientes presentaron criptorquidia abdominal, tres de ellos bilaterales y cuatro unilaterales; en los cuales el diagnóstico histológico fue atrofia testicular acentuada o severa, fibrosis, hipoplasia de células testiculares, detención de la maduración y microlitiasis.

Las alteraciones histológicas observadas en el epitelio seminífero de nuestros pacientes, podrían estar asociadas a las alteraciones que se presentan en testículos con CISt, ya que el parénquima testicular con CISt a menudo se atrofia y puede contener signos de disgenesia de los tubos completamente diferenciados, espermatogénesis pobre y microlitiasis (microcalcificaciones) (Hoei-Hansen et al, 2003). La presencia de atrofia y microlitiasis en algunos de nuestros pacientes, corresponde a lo ya reportado para el desarrollo del CISt, además al considerar la expresión de los tres marcadores de pluripotencialidad, podría ser que estos pacientes ya



presentaran un CISt desarrollado en una etapa temprana de la vida. Aunque se sugiere (nadie lo ha confirmado) que las células del CISt permanecen en reposo durante la infancia, éstas pueden proliferar durante la pubertad, probablemente debido a la estimulación hormonal propia de la pubertad. Una vez que fue diagnosticado el CISt, se presenta un riesgo estimado de desarrollar un crecimiento invasivo (seminoma) de un 50% en 5 años y el 70% en 7 años después del diagnóstico del CISt (Von der Maase et al, 1986). Se propone que todos los pacientes portadores del CISt desarrollarán un seminoma con el tiempo, aunque rara vez, los casos de desaparición del CISt han sido reportados.

Se conoce que los testículos criptorquídicos son disgenéticos, lo cual condiciona una alteración funcional del mismo. Un individuo con una criptorquidia unilateral, puede tener un testículo contra lateral, normalmente descendido pero genéticamente disgenético, por lo cual, a pesar de que curse con números normales de espermatogonias, esas células tienen un contenido de ADN anómalo y su maduración será defectuosa (Codesal et al, 1993). En los seis pacientes con criptorquidia unilateral, también se observaron alteraciones histológicas y positividad a proteínas de pluripotencialidad (FA, c-Kit y Oct3/4), de estos pacientes sólo a 4 se les realizó orquiectomía y a dos orquidopexia del testículo no descendido.

En nuestros pacientes infantiles y púberes la mayoría de los testículos criptorquídicos presentaron anormalidades en todas las estructuras del testículo desde reducción de las áreas de los tubos seminíferos hasta clara alteración en la espermatogénesis. También se observaron áreas de hipoplasia de células de Leydig tal y como lo reportaron Nistal y Paniagua (2003), para el testículo criptorquídico. La hipoplasia, de células de Leydig pudo estar asociada a la deficiencia de testosterona que presentaron los pacientes, así como lo presentaron Regadera et al. (1991) quienes empleando técnicas de inmunohistoquímica, detectaron una disminución de la testosterona en células de Leydig de testículos criptorquídicos.



La disminución del diámetro de los tubos seminíferos, el aumento del espesor de la membrana basal, fibrosis, hemorragia y el agrandamiento de los espacios ínter tubulares presente en los tejidos testiculares de nuestros pacientes, ya ha sido reportado por Hedinger (1982), quien describe el aumento de espesor de la membrana basal en los testículos criptorquídicos de pacientes adultos. Mininberg et al, (1982), identifica fibrosis de la lámina tubular en niños con criptorquidia durante el primer año de vida y Hadziselimovic (1977), reporta la presencia de fibrosis durante el tercer año de edad.

El engrosamiento de la membrana basal aumenta con la edad en los testículos criptorquídicos (Slowikowska et al, 2005), lo que indica que la edad por sí misma puede tener un efecto perjudicial. En nuestro estudio el número de túbulos seminíferos con el engrosamiento de la membrana basal y atrofia severa fue mayor en pacientes con positividad a los marcadores de pluripotencialidad. Esto podría indicar que el espesor de membrana tubular, considerado hasta ahora como patología testicular inespecífica, puede ser un parámetro importante de TDS, indicativa de la aparición de CIST.

Se ha sugerido que las lesiones de la membrana basal en los testículos criptorquídicos podrían estar relacionadas con la inhibición de la maduración/diferenciación de las células de Sertoli, de las células de Leydig y de las células peritubulares. Parece poco probable que el deterioro en la maduración de las células Sertoli resulta principalmente del aumento de la temperatura del medio ambiente testicular durante la infancia (Santamaría et al, 1990).

Nuestros pacientes criptorquídicos presentaron hipoplasia de células germinales, probablemente asociada a la falta de maduración de las células de Sertoli, a su degeneración o a una falta de diferenciación de los gonocitos con daño permanente de las células germinales. Regadera et al, 2001 han reportado que la ausencia de receptores de andrógenos en las células de



Sertoli inmaduras de los testículos con criptorquidia se correlaciona con hipoplasia de los tubos seminíferos y la ausencia de diferenciación de células germinales. La presencia de estas lesiones en los tubos seminíferos pueden ayudar a explicar por qué la intervención quirúrgica para descender el testículo en el escroto, incluso cuando se realiza tempranamente en la vida, no puede restaurar el inicio normal de la espermatogénesis. Aunque otros estudios indican que la criptorquidia se asocia con cambios degenerativos en las células de Sertoli y células germinales (Lee y Coughlin, 2000). También se han propuesto que los gonocitos no se diferencian a espermatogonias A por la influencia de factores intrauterinos como la exposición a compuestos con actividad durante la gestación, Slowikowska et al, (2003), demuestran que el retraso en el desarrollo de los tubos seminíferos se asocia con alta incidencia (12,9%) de las neoplasias de células germinales. Ya que demuestran que las lesiones neoplásicas se encuentran en los testículos con espermatogénesis anormal o incompleta.

En pacientes con criptorquidia, se han documentado datos histológicos que indican disminución del diámetro de tubos seminíferos y del volumen testicular relacionado con deterioro espermático (Lee y Coughlin, 2001). En nuestros pacientes se observó que el área de los tubos seminíferos disminuyó significativamente en un 24%, y esta disminución alteró el diámetro de los tubos haciendo que estos fueran más pequeños. En estudios experimentales se ha observado que el aumento de temperatura en el testículo puede alterar su desarrollo, específicamente el diámetro tubular, el cual depende principalmente de la maduración de las células de Sertoli (Gómez, 2004).

En la gráfica 1, se observó una disminución significativa de nuestros pacientes criptorquidicos comparado con el grupo control, además de una disminución del área de los pacientes criptorquidicos positivos comparado con las áreas de los pacientes criptorquidicos negativos. Dicho comportamiento podría sugerir mayor atrofia y probable malignización en los pacientes con positividad a las proteínas estudiadas.



Algunos estudios atribuyen infertilidad y cáncer en pacientes con criptorquidia como causa de una posible disgenesia gonadal fetal (Ofordeme et al, 2005). En nuestros pacientes, observamos células morfológicamente idénticas a gonocitos ubicadas en el centro de los tubos seminíferos, y las caracterizamos como células germinales indiferenciadas, sin embargo también se observó este mismo tipo celular en contacto con la membrana basal de los tubos seminíferos lo que contrarresta lo reportado en la literatura, ya que la migración del gonocito hacia la membrana basal es un proceso importante para su diferenciación a espermatogonia y en nuestros pacientes observamos que además esas células ubicadas en la lámina basal, también fueron positivas a marcadores de pluripotencialidad. Algunos estudios sugieren que esto puede deberse a que las células de Sertoli presentaron algunos cambios en su función secretora (J'egou y Sharpe, 1993; Sharpe et al, 1993; Boujrad et al, 1995; Guitton et al, 1999) probablemente debido a falta de factores producidos por las células de Sertoli. Pero también se propone se debe a la persistencia en la expresión de factores de pluripotencialidad por los gonocitos y se afirma que la ausencia de células germinales puede dar lugar a la des-diferenciación de las células de Sertoli, lo cual podría estar afectando su capacidad de sintetizar ciertas proteínas necesarias para la diferenciación de los gonocitos. Sin embargo, es importante reconocer que la ausencia de células germinales puede ser un reflejo de anomalías subyacentes en las células de Sertoli, como la insuficiencia de su maduración (Steger et al, 1996; Maymon et al, 2000) (figura 29), estos cambios que se presentan en las células de Sertoli y los mismos gonocitos dan pie a una probable malignización del gonocito dando origen posiblemente a las células del CIS.

**PROBABLE MECANISMO DE TRANSFORMACIÓN
(Células de Sertoli y Gonocitos)**

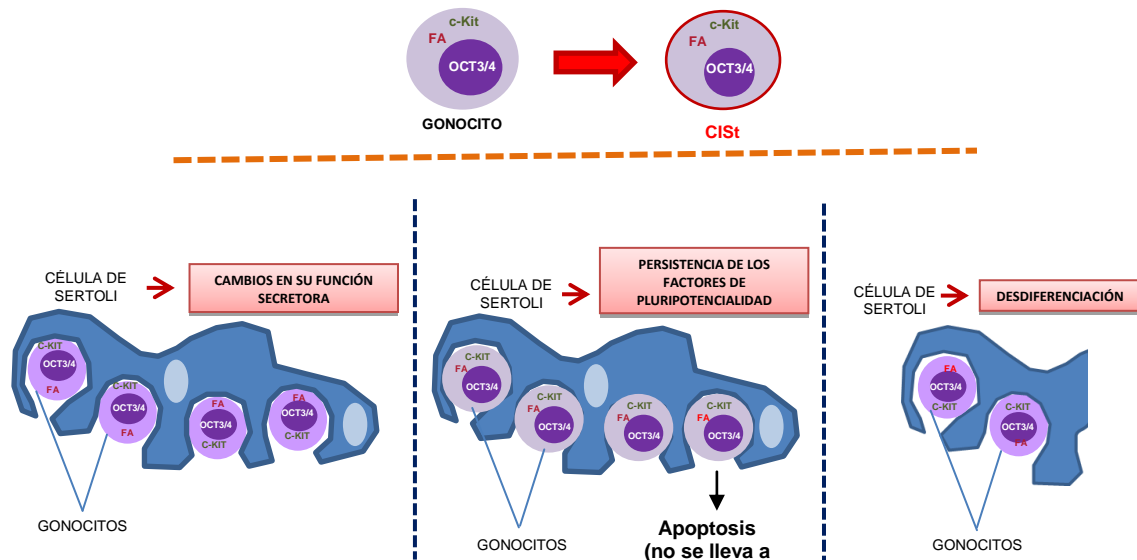


Figura 29: Probable mecanismo de transformación del gonocito a célula del CIST, se proponen cambios en la función secretora de las células de Sertoli o desdiferenciación de las mismas, además de la persistencia de los factores de pluripotencialidad en el gonocito.

No sabemos la vía biológica real de la transformación maligna de las células germinales, pero algunos factores involucrados en este proceso incluyen a OCT3/4, AP-2 γ y c-kit que están estrictamente regulados en las células germinales fetales. Todos ellos son co-expresados durante el desarrollo fetal en la población de células germinales con las características morfológicas de gonocitos. Antes de que la célula germinal se diferencie a pre-espermatogonia, se presenta la regulación a la baja de OCT3/4, AP-2 γ y c-kit. En contraste, las células germinales que se mantienen en el centro de los cordones seminíferos y continúan expresando OCT3/4, c-KIT o AP-2 γ en las etapas finales del embarazo degeneran. Este hallazgo apoya la idea de que la reubicación de gonocitos es esencial para su supervivencia (Nagano et al, 2000). Nuestros resultados se contraponen a lo reportado, ya que 11 pacientes desde el primer año hasta los 15 años de edad, presentaron células germinales positivas a OCT3/4, c-Kit o FA y éstas se ubicaron en el centro y hacia la



membrana basal de los cordones/tubos seminíferos, de éstos, 5 pacientes fueron positivos a los tres marcadores de pluripotencialidad.

En total, nueve tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia presentaron reacción positiva para OCT3/4, estos pacientes estuvieron presentes en tres grupo de edad diferentes, de tal manera que desde el primer año hasta los 15 años pudimos observar positividad para dicha proteína, comparado con nuestro grupo control, el cual tuvo solo 6 tejidos testiculares positivos durante los primeros 6 meses de edad. Podemos suponer que la expresión del OCT3/4, probablemente sea un factor importante que participe en la alteración del funcionamiento normal del testículo o predisponga el desarrollo neoplásico del testículo.

La inmunoreactividad positiva a OCT3/4 en nuestros pacientes puede estar asociada al desarrollo del CIST debido a que el OCT3/4 es un factor de transcripción con un papel crítico en la regulación de la pluripotencialidad en estadios muy tempranos del desarrollo en mamíferos (Brehm et al, 1998). Se ha demostrado que las concentraciones de OCT3/4 son esenciales para mantener las células madre embrionarias (auto-renovación) y cualquier alteración en la regulación puede modificar el destino celular (Niwa et al, 2000). Algunos datos indican que OCT3/4 funciona como un interruptor maestro en la diferenciación mediante la regulación de las células que tienen, o pueden desarrollar pluripotencialidad (Looijenga et al, 2003).

El gen OCT3/4 codifica para un factor de transcripción el cual se encuentra involucrado en el establecimiento de la línea germinal en mamíferos. La expresión de OCT3/4 regula la pluripotencialidad, diferenciación de las células madre embrionarias y es necesaria para la sobrevivencia y migración de las células germinales primordiales (Yeom et al, 1996). Sin embargo, algunos autores suponen que en el CIST la proteína OCT3/4 se encuentra en células germinales localizadas en la lámina basal y en el centro de tubos seminíferos y debajo de las uniones estrechas entre las células de Sertoli



(Martin et al, 2004), lo cual concuerda con lo observado en los testículos de pacientes con criptorquidia. En consecuencia, se ha sugerido que la expresión de OCT3/4 después de los 4 meses de edad, en niños con criptorquidia, se podría considerar como el principal factor de riesgo para la transformación maligna de las células germinales primordiales (Gideke et al, 2003; Looijenga et al, 2003).

OCT3/4 se encuentra unido a un gran número de genes diana implicados en el mantenimiento de la pluripotencialidad. La actividad biológica de OCT3/4 depende en gran medida de sus niveles de expresión. Así los niveles altos de OCT3/4 inducen la expresión de marcadores de endodermo (Rodríguez et al, 2007). Esto ilustra la complejidad del proceso de transcripción, sugiriendo que a partir de un determinado nivel de expresión de OCT3/4 forma parte de nuevos complejos que regulan nuevos genes (Sieweke y Graf, 1998) (figura 30).

OCT3/4, SOX2 y NANOG son factores de transcripción que conjuntamente actúan para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células germinales (Lewitzky y Yamanaka, 2007), OCT3/4 junto con SOX2, son factores necesarios para mantener la capacidad de pluripotencialidad y auto renovación de la células germinales. NANOG junto con OCT3/4 aumenta la capacidad de auto renovación y del mantenimiento de un estado indiferenciado pluripotente de la célula (Nichols et al, 1998), dando lugar probablemente a que los gonocitos que expresen estos factores en etapas posteriores a los 4 meses de edad, podrían originar el desarrollo de células del CIST (figura 30).

Se ha demostrado que OCT3/4 está implicado en el proceso oncogénico de gonadoblastoma (GB), los detalles moleculares de la falla en la regulación de OCT3/4 aun se desconocen. Sin embargo, la expresión de éste en las células germinales inmaduras sugiere que las alteraciones en la regulación de activadores localizados, así como mutaciones de la proteína ocasionan una desregulación en la expresión del OCT3/4 incrementando el potencial maligno



de las células germinales (Kehler et al, 2004). Por lo cual, la expresión de OCT3/4 en los testículos de nuestros pacientes con criptorquidia podría ser un blanco de malignización, debido a la expresión de esta proteína ocasionando el desarrollo de un CISt y posteriormente un seminoma.

Aunque el mecanismo molecular por el cual el marcador OCT3/4 presenta alteraciones en la regulación permanece incierto, una de las moléculas que se han sugerido como cofectora del OCT3/4 en el desarrollo oncogénico es la proteína β -catenina (Polakis, 2000; Van de Wetering et al, 2002; Taipale y Beachy 2001). El mecanismo por el cual ejerce su función aún no es claro, pero se sabe que β -catenina también actúa a través de E-cadherina, como mediador de la adhesión intercelular dependiente de Ca^{2+} . E-cadherina tiene actividad de tumor supresor y las alteraciones en su regulación facilitan la transformación celular. Algunos estudios previos han analizado si la β -catenina y E-cadherina pudieran estar involucradas en la patogénesis del tumor de células germinales (TCG), pero no se han obtenido datos concluyentes (Saito et al, 2000) (figura 29). Las observaciones de estos estudios y los resultados obtenidos para OCT3/4 en nuestros pacientes nos permiten proponer que la proliferación de células germinales en el testículo criptorquídicico puede ser debido a una interacción entre OCT3/4 y β -catenina acumulada en los núcleos de las células germinales inmaduras, llevando al desarrollo de un comportamiento invasivo y la progresión de CISt hacia seminoma en testículos no descendidos, sin olvidar la asociación de otras moléculas relacionadas.

PROBABLE MECANISMO DE TRANSFORMACIÓN (OCT3/4)

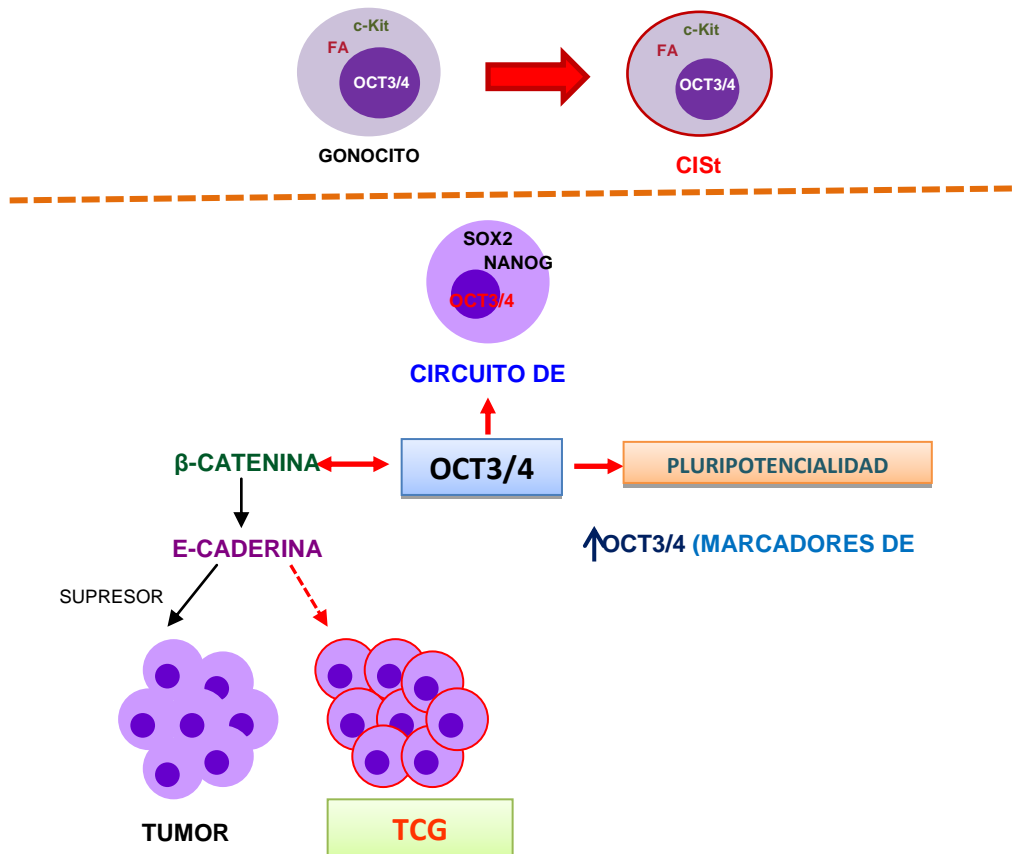


Figura 30: Probable mecanismo de transformación del Gonocito a célula del CIS. Se observan tres mecanismos que podrían estar involucrados en este proceso de transformación el los cuales podrían estar involucrados β -catenina y E-caderina, los niveles de expresión de OCT3/4 y la alteración de un circuito de autorregulación.

En total, cinco tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia presentaron reacción positiva para c-Kit, también estos pacientes estuvieron presentes en tres grupo de edad diferentes, de tal manera que desde el primer año hasta los 15 años pudimos observar positividad para dicha proteína, comparado con nuestro grupo control, el cual tuvo solo 4 tejidos testiculares positivos durante los primeros 6 meses de edad. Podemos suponer que la inmunoreactividad positiva del c-Kit, probablemente sea importante, ya que



podría alterar el funcionamiento normal del testículo o predisponer el desarrollo neoplásico del testículo.

El c-Kit es un factor importante para la migración de las CGP, la expresión de éste fue descrita por primera vez en un tumor de células germinales por Strohmeyer et al, (1991) y en el CIST por Rajpert y Skakkebaek (1993), Izquierdo et al (1995); Strohmeyer et al, (1995) y Bokemeyer et al, (1996). La expresión es gradualmente reducida con la edad y se ha propuesto que la expresión de c-Kit puede contribuir al desarrollo neoplásico prolongando la supervivencia de células pluripotenciales (Stoop et al., 2008).

Es una proteína que actúa como un sistema de señalización esencial para la supervivencia, migración y diferenciación de células germinales tempranas (Dolci et al, 1991, 2001; Godin et al, 1991; Pesce et al, 1993; Yan y Suominen, 2000). La expresión de c-Kit es fuerte en gonocitos de humano y rata en etapas fetales e infantiles (Jørgensen et al, 1995; Robinson et al, 2001; Gaskell et al, 2004; Honecker et al, 2004). Y se ha reportado que su expresión en el testículo humano está presente en un nivel muy alto en CGP y en la mayoría de gonocitos durante el primer trimestre de gestación, en tanto que la expresión se ve reducida o nula en las espermatogonias del testículo humano en la etapa adulta (Jørgensen et al, 1995; Gaskell et al, 2004; Honecker et al, 2004).

Además, se ha informado recientemente que muchos gonocitos neonatales expresan c-Kit durante el periodo de desarrollo cuando están en constante movimiento hacia la membrana basal. Esta observación plantea la posibilidad de que la expresión de c-Kit puede ser importante para la migración de estas células neonatales (Orth et al, 1997). Lo cual es contradictorio con nuestros resultados ya que, como ya se mencionó, la mayoría de las células que expresaron c-Kit se ubicaban en el centro y en la lámina basal de los tubos seminíferos y en edades en las cuales la migración de las células germinales



ya tenía que haber concluido, pues estas células estuvieron presentes de manera anormal en nuestros pacientes hasta los 18 años de edad.

La retención de una expresión muy alta de c-Kit más allá de una ventana normal (después de los 4 meses de edad) se observó en algunos de nuestros pacientes, en edades posteriores al primer año de edad y aunque se ha reportado que c-Kit también se expresa muy poco en espermatogonias del testículo humano adulto (Rajpert-De Meyts et al, 2003b), es importante señalar que la expresión de dicha proteína en algunos de nuestros pacientes puede deberse a este porcentaje de expresión en espermatogonias, pero en el caso de los tejidos de pacientes donde hubo mayor inmunoreacción a c-Kit, podrían considerarse como células pluripotentes o gonocitos.

Como c-Kit es un potente factor de supervivencia al menos para las células germinales primordiales (Kierszenbaum, 1994) y algunas espermatogonias, su expresión prolongada podría dar una ventaja de crecimiento a las células supervivientes indiferenciadas. Esta observación, junto con una asociación conocida del CIST, con un escaso desarrollo gonadal, conduce a una nueva hipótesis de que un retraso en la diferenciación podría ser uno de los mecanismos de transformación neoplásica de las células germinales (Rajpert-De Meytsetal, 1998a).

El c-Kit, es un factor antiapoptótico importante que se expresa en células germinales, y la sobreexpresión de esta proteína podría afectar alguna vía apoptótica, haciendo que las células germinales que expresen esta proteína más allá de la ventana de tiempo determinada, sobrevivan y se mantengan como indiferenciadas y pluripotentes, éste es el caso que podría presentarse en nuestros pacientes con criptorquidia que fueron positivos a c-Kit, principalmente en edades posteriores al año de edad.

En una célula de funcionamiento normal que expresa c-kit, el factor de crecimiento de células madre (SCF) se puede unir a la parte externa del



receptor y activarlo mediante la fosforilación. La fosforilación iniciaría una serie de reacciones químicas dentro de la célula. La activación del receptor c-Kit comienza a enviar una corriente de señales que se traduce en la proliferación y supervivencia celular.

Se ha reportado que en las células de Tumores Gastrointestinales (GIST por sus siglas en inglés), el gen c-kit se encuentra mutado aproximadamente el 80% del tiempo. Cuando el gen está mutado, el receptor c-kit no está ensamblado a la perfección. Las mutaciones en c-kit resultan en un cambio en la forma y en la función del receptor manteniéndolo constantemente activo.. Esto significa que, incluso sin la señal normal de su ligando SCF, los receptores siguen produciendo un estímulo constante para que las células del tumor GIST se dividan y sobrevivan (Michael et al, 2011). Es probable que éste mecanismo por el cual c-Kit es alterado, se presente de igual modo en nuestros pacientes positivos a esta proteína dando origen a que el gonocito se convierta a una célula del CISt (figura 31).

En general, ocho tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia presentaron reacción positiva para FA, estos pacientes estuvieron distribuidos en tres grupo de edad diferentes, de tal manera que desde el primer año hasta los 15 años pudimos observar positividad para dicha proteína, comparado con nuestro grupo control, el cual sólo tuvo 9 tejidos testiculares positivos durante los primeros 6 meses de edad. Podemos suponer que la expresión de FA, probablemente sea un factor importante que participe en la alteración del funcionamiento normal del testículo o predisponga el desarrollo neoplásico del testículo, ya que, el marcador más comúnmente utilizado en la práctica clínica es la FA (Manivel et al, 1987), una fosfatasa alcalina específica del tejido con función biológica desconocida en las células del CISt.

La FA es una enzima generada por las CGP, que permite su desplazamiento desde el alantoides hacia las crestas genitales. La presencia de esta enzima permite identificar este tipo celular, a los gonocitos y a células



del CIST (Buehr et al, 1993). En nuestros resultados encontramos gonocitos que expresaron FA en sus pseudópodos, pero también se pudieron observar gonocitos en tejido testicular que prácticamente, podía ya ser considerado como CIST, debido a que en estos tejidos testiculares de los pacientes se expresaban tres marcadores (OCT374, c-Kit y FA), que como ya se ha mencionado, son utilizados en la práctica clínica para diagnóstico de CIST.

La FA es un dímero con peso molecular de 120 000. La enzima entra a la circulación materna como resultado de un intercambio metabólico, pudiendo ser detectada en el suero de la madre, pero no en suero fetal. Se sabe es regulada negativamente por la Fenilalanina y positivamente por la L-homoarginina, además de que esta enzima es termosensible (García y Villalobos, 1984). Estas características que regulan la expresión de FA podrían verse alteradas en nuestros pacientes con criptorquidia positivos a FA, ya que la expresión constante de esta enzima podría deberse probablemente a alguna alteración en la Fenilalanina evitando que se deje de expresar o en la L-homoarginina provocando que se exprese constantemente en estos pacientes. También podría ser que la elevada temperatura testicular de estos pacientes con criptorquidia esté afectando la expresión de FA haciendo que ésta se exprese más tiempo, provocando así que los gonocitos de pacientes con criptorquidia positivos a FA probablemente den origen a células del CIST (Figura 31).

Las isoenzimas que más se han encontrado en tumores son muy similares a la FA. Se encuentran en el 8-25% del suero de individuos con cáncer. Se ha sugerido que la síntesis de FA, por células malignas de origen no trofoblástico, puede representar una disrupción del locus estructural para la FA en estas células (figura 31). Se ha identificado esta isoenzima en pacientes con seminoma, carcinoma de ovario y carcinoma pancreático, entre otros (Ehrmeyers et al, 1978).

La positividad a FA en algunos de nuestros pacientes, puede aportar datos de la transformación maligna del CIST, sin embargo estamos conscientes de que las alteraciones que participan en la transformación oncogénica de las células germinales, incluyen la suma de varios mecanismos. Dicha transformación maligna puede ser el resultado de re-arreglos cromosómicos que interrumpen la expresión de genes supresores de tumores, ganancias o pérdidas génicas, mutaciones en genes supresores de tumores o como en este caso por la expresión anormal de proteínas proliferativas y de sobrevivencia o pluripotencialidad. Por lo tanto, cabe señalar que de los pacientes que presentaron positividad en un rango de edad de 2-18 años, no necesariamente todos desarrollen un CIST, debido a que hay varios mecanismos que determinan el desarrollo de dicha patología.

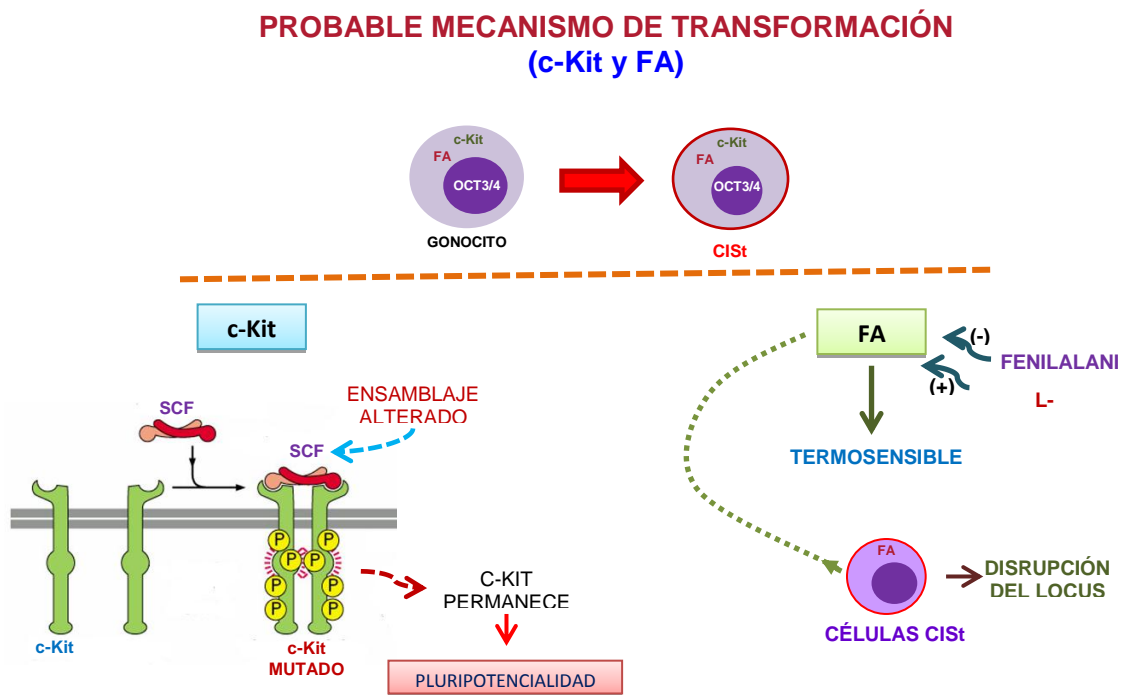


Figura 31: Probable mecanismo de transformación del gonocito a célula del CIST, se observa una alteración en el receptor de c-kit el cual permanece activo, manteniendo probablemente al gonocito como pluripotente. Se observan los mecanismos que regulan FA, los cuales probablemente se alteren en pacientes con criptorquidia positivos a esta enzima, dando origen a células del CIST.



De los 41 pacientes con criptorquidia, se obtuvo un total de 11 pacientes positivos a por lo menos un marcador de pluripotencialidad e indiferenciación, los cuales corresponden al 26.82% de nuestros pacientes. Con base a lo propuesto en la literatura se propone que aproximadamente el 1-4% de estos pacientes desarrollarán un CISt (Giwerzman et al, 1989), y el resto probablemente logrará tener un desarrollo normal del testículo. Estos están representados por nuestros pacientes criptorquidicos de 0 a 1 año de edad y de 2 a 10 años de edad; para los cuales se propusieron cuatro vías probables por las cuales los gonocitos pluripotentes e indiferenciados, podrían morir, desarrollarse y diferenciarse de manera normal o desarrollar un CISt y un seminoma posteriormente.

La primera vía propuesta (figura 32), es que el gonocito de pacientes con criptorquidia, se mantenga expresando estas proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación y posteriormente entre en apoptosis, evitando así que en ciertos pacientes se desarrolle el CISt. La segunda vía por la cual el gonocito podría desarrollarse sería que, a pesar de que se mantuvo expresando estas proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación, logre diferenciarse a espermatogonia y establezca posteriormente una espermatogénesis normal aunque quizá con baja producción de espermatozoides. La tercera vía que podría seguir el gonocito pluripotente e indiferenciado, es que permanezca así, presentando un retraso en su diferenciación, pero logrando establecer una espermatogénesis completa aunque probablemente con baja producción de espermatozoides, comprometiendo así la fertilidad del paciente (figura 32).

Y finalmente la última vía, la cual pude probablemente estar reflejada en nuestros pacientes de 11 a 15 años de edad, en los cuales ya podrían ser diagnosticados con CISt. Los gonocitos de estos pacientes permanecen pluripotentes e indiferenciados dando origen a un CISt el cual permanece quiescente en edades tempranas, siendo quizá la misma pubertad, el etilo de vida, la genética o los factores ambientales los que desencadenen la capacidad invasiva de la célula, desarrollando así un seminoma (figura 32).



La cantidad de tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia, positivos a marcadores de pluripotencialidad e indiferenciación, se delimitó con base a nuestros criterios de inclusión y exclusión, y de un total de 400 pacientes con criptorquidia y 1100 pacientes controles, solo se seleccionaron 41 y 30 tejidos testiculares respectivamente. Realmente no se realizó el cálculo de la “n” y solo se trabajó con los tejidos testiculares disponibles, por lo cual nuestra “n” se vio disminuida, sin embargo, consideramos que nuestros resultados perfectamente pueden contribuir al conocimiento del desarrollo del CIST a partir de gonocitos de pacientes con criptorquidia, ya que al comparar publicaciones de otros autores, consideramos que la cantidad de pacientes en nuestro estudio es un número considerable y no tan pequeño, ya que autores como; Honecker et al , 2004, quien determina la expresión de marcadores en testículos con CIST y células germinales fetales, utiliza solo 27 hombres, a los cuales divide en varios grupos y Guminska et al, 2007, realizó un estudio con biopsias testiculares de solo 39 hombres. Así como nosotros, estos y varios autores presentan una “n” aparentemente pequeña, debido a diferentes factores. Pero los resultados pueden ser confiables si consideramos y comparamos nuestros resultados con los obtenidos en otros estudios publicados.

PROBABLES VÍAS DE TRANSFORMACIÓN DEL GONOCITO A CÉLULA DEL CIST.

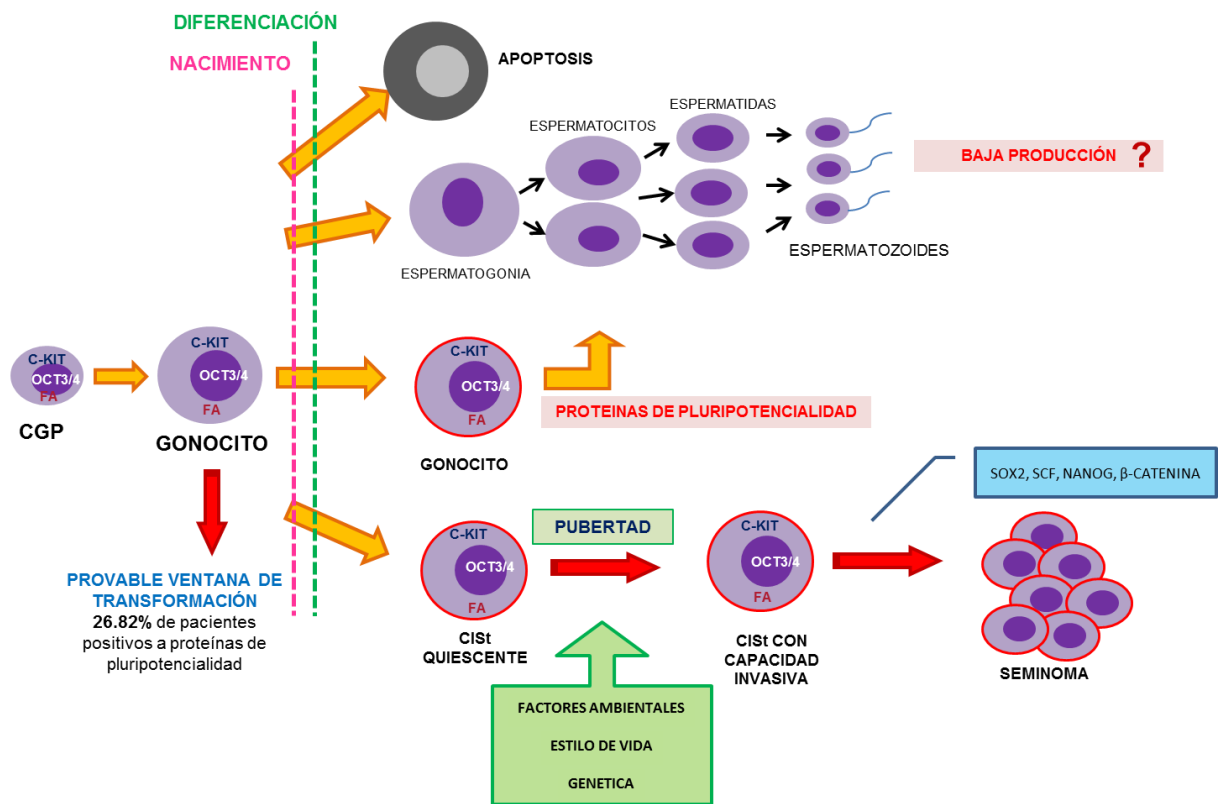


Figura 32: Se ilustra la línea por la cual un gonocito normalmente se diferencia en un paciente sano hasta dar origen a espermatozoides y se muestran tres vías probables por las cuales los gonocitos se ven afectados durante su diferenciación debido a la presencia de proteínas de pluripotencialidad dando origen a CIST seguido de un seminoma en pacientes con criptorquidia.

Este trabajo contribuye aportando más herramientas que permiten conocer el mecanismo de transformación maligna de estos tumores y abre nuevas perspectivas para el diagnóstico oportuno de estos pacientes, así como el establecimiento en el futuro de alternativas terapéuticas innovadoras para este tipo de tumores. La confirmación en la expresión de estas proteínas permitirá el uso de marcadores tempranos para el diagnóstico oportuno del CIST y a mediano plazo, se logrará proponer alternativas de inducción de la diferenciación de los gonocitos. Lo anterior podrá disminuir el riesgo de desarrollar seminoma, al abrir la posibilidad a futuro de la aplicación de programas de detección de riesgos, la disminución de la frecuencia de la enfermedad y una mayor selectividad de los tratamientos. Esto a su vez



permitirá la reducción en los costos asistenciales de los pacientes en las instituciones de salud generados por esta patología y así aumentar la calidad de vida de la población afectada.

9. Conclusiones

Los gonocitos de once pacientes con criptorquidia, no se diferenciaron y siguieron expresando factores de pluripotencialidad e indiferenciación (OCT3/4, c-Kit y FA).

La disminución del área de cordones/tubos seminíferos está comprometida a la presencia de marcadores como OCT3/4, C-Kit y FA, lo que sugiere que a mayor cantidad de expresión de marcadores de pluripotencialidad e indiferenciación, mayor atrofia testicular.

Las alteraciones histopatológicas, presentes en tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia, no están asociadas a la expresión de marcadores de pluripotencialidad e indiferenciación (OCT3/4, c-Kit y FA).



10. BIBLIOGRAFIA

- Acerini C.L., Miles H.L., Dunger D.B., Ong K.K., Hughes I.A. (2008).** The descriptive epidemiology of congenital and acquired cryptorchidism in a UK infant cohort. *Arch Dis Child*; 94 (11): 868-72.
- Ashley L. y Armitage G. (2010).** Failure mode and effects analysis: an empirical comparison of failure mode scoring procedures. *Journal Patient Safety*; 6(4): 210-5.
- Almstrup K., Hoei-Hansen C. E., Wirkner U., Blake J., Schwager C., Ansoerge W., Nielsen J. E., Skakkebaek N. E., Rajpert-De Meyts E., Leffers H. (2004).** Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Research*; 64 (14): 4736-43.
- Almstrup K., Nielsen J. E., Mlynarska O., Jansen M. T., Jorgensen A., Skakkebaek N. E., Rajpert- De Meyts E. (2010).** Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Journal Cancer*; 103 (8): 1269-76.
- Andrews P. W., Banting G., Damjanov I. (1984).** Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Cancer Research*; 3:347–361.
- Arambepola N. K., Bunick D. y Cooke P. S. (1998).** Thyroid hormone effects on androgen receptor messenger RNA expression in rat Sertoli and peritubular cells. *Journal of Endocrinology*; 156 43–50.
- Ariyaratne H. B. S., Mendis-Handagama S. M. L. C. (2000).** Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Reproduction*; 62:680–690.
- Aubry F., Satie A. P., Rioux-Leclercq N. (2001).** MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer*; 92:2778–2785.
- Ayala F. J. (1995).** The myth of Eve: molecular biology and human origins. *Science*; 270 (5244):1930-6.
- Baillie A. H. (1964).** Further observations on the growth and histochemistry of Leydig tissue in the postnatal prepubertal mouse testis. *Journal Anatomy*; 98: 403-429.
- Barthold, J. S., Kumasi-Rivers, K., Upadhyay, J., Shekarriz, B. y Imperato-McGinley, J. (2000).** Testicular position in the androgen insensitivity syndrome: implications for the role of androgens in testicular descent. *Journal Anatomy*; 164, 497–501.
- Basciani S., De Luca G., Dolci S., Brama M., Arizzi M., Mariani S., Rosano G., Spera G., Gnessi L. (2008).** Platelet-derived growth factor receptor beta-subtype regulates proliferation and migration of gonocytes. *Endocrinology*; 149:6226-6235.
- Bay E. H., Blow A.J. Yan X.E. (2011).** Interpersonal relatedness and psychological functioning following traumatic brain injury: implications for marital and family therapists. *Journal Marital and Family Therapy*; 38 (3): 556-67.
- Behringer R. R., Finegold M. J., Cate R. L. (1994).** Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell*; 79 (3): 415-25.
- Bendel P., Frantz A., Ziberstein J., Kabalka G. W., Salomon Y. (1998).** Boron-11 NMR of borocaptate: relaxation and in vivo detection in melanoma-bearing mice. *Magnetic Resonance in Medicine*; 39(3):439-47.



- Berkowitz R. S., Goldstein D. P. (1995).** Gestational trophoblastic disease. *Cancer*; 76 (10):2079-85.
- Biermann K., Klingmüller D., Koch A., Pietsch T., Schorle H., Büttner R., Zhou H. (2006).** Diagnostic value of markers M2A, OCT3/4, AP-2gamma, PLAP and c-KIT in the detection of extragonadal seminomas. *Histopathology*; 49 (3):290-7.
- Boujrad N., Hocherau-de Reviers M. T. y Carreau S. (1995).** Evidence for germ cell control of Sertoli cell function in three models of germ cell depletion in the adult rat. *Biology of Reproduction*; 53 1345–1352.
- Bokemeyer C., Köhrmann O., Tischler J., Weissbach L., Räh U., Harstrick A., Schmoll H.J. (1996).** A randomized trial of cisplatin, etoposide and bleomycin (PEB) versus carboplatin, etoposide and bleomycin (CEB) for patients with good-risk metastatic non-seminomatous germ cell tumors. *Annals Oncology*; 7(10):1015-21.
- Brannan C. I., Bedell M. A., Resnick J. L., Eppig J. J., Handel M. A., Williams D. E., Lyman S. D., Donovan P. J., Jenkins N. A., Copeland N. G. (1992).** Developmental abnormalities in Steel17H mice result from a splicing defect in the steel factor cytoplasmic tail. *Genes Development*; 6:1832–1842.
- Brehm B. R., Meergans M., Axel D. I., Pfohl M., Karsch K. R. (1998).** Downregulation of beta-adrenergic receptors by low density lipoproteins and its prevention by beta-adrenergic receptor antagonists. *Cardiovascular Pharmacology*; 38(2):522-30.
- Brinster, R. L. (2002).** Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*; 296, 2174–2176.
- Bokemeyer C., Köhrmann O., Tischler J., Weissbach L., Räh U., Haupt A., Schöffski P., Harstrick A., Schmoll H. J. (1996).** A randomized trial of cisplatin, etoposide and bleomycin (PEB) versus carboplatin, etoposide and bleomycin (CEB) for patients with “good-risk” metastatic non-seminomatous germ cell tumors. *Annals Oncology*; 7(10):1015-21.
- Buerh M. S. Gu y A. McLaren. (1993).** “Mesonephric Contribution to Testis Differentiation in the Fetal Mouse”. *Development*; 117: 273-281.
- Buehr M., McLaren A., Bartley A., Darling S. (1993).** Proliferation and migration of primordial germ cells in *We / We* mouse embryos. *Development Dynamics*; 198:182–189.
- Byscove A. G. (1986).** Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews*; 66:77–112.
- Campbell-W., Alan J. Wein, Louis R. Kavoussi, M. D., Andrew C. Novick, Alan W. Partin, M. D., Craig A. Peters, M. (2009).** *Urología*, 9th edición, editorial medica panamericana, Argentina.
- Cain M. P., Kramer S. A., Tindall D. J., Husmann D. A. (1994a).** Epidermal growth factor reverses antiandrogen induced cryptorchidism and epididymal development. *Journal Urology*; 152(2 Pt 2):770-3
- Capel B., Albrecht K., Washburn L. L., Eicher E.M. (1999).** Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mechanisms Development*; 84(1-2):127-131.
- Carreau S., Genissel C., Bilinska B. and Levallet J. (1999).** Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male *International Journal of Andrology*; 22 211–223.



- Castrillon D. H., Quade B. J., Wang T. Y., et al. (2000).** The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy Sciences*; 97:9585–9590.
- Chavarría L., Alonso J., Rovira A., Córdoba J. (2011).** Neuroimaging in acute liver failure. *Neurochemistry International*; 59(8):1175-80.
- Chemes H. E., Payne A. H., Hardy M. P., Russell L. D. (1996).** The Leydig Cell. Vienna, IL: Cache River Press; 175–202.
- Chen G., Wang Z., Liu X. (2009).** Advance on Chemokines in Organ-specific Metastasis of Non-small Cell Lung Cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*; 12(10):1110-4.
- Clark A. M., Garland K.K., Russell L.D. (2000).** Desert hedgehog (*Dhh*) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biology of Reproduction*; 63: 1825–1838.
- Clausen O.P.F., Purvis K., Hansson V. (1981).** Hlh specific binding to rat interstitial cells. *Endocrinology*; 96:569– 576.
- Clark A.T. (2007).** The stem cell identity of testicular cancer. *Stem Cell Reviews* 3:49–59.
- Clermont y Perey B. (1957).** The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA- Schiff-hematoxylin and hematoxylin-eosin stained sections. *Reviews Can Biology*; 16(4):451-62.
- Cortes D. (1998).** Cryptorchidism-aspects of pathogenesis, histology and treatment. *Sacand Journal Urology Nephrology Supplement*; 196:1-54.
- Codesal J., Paniagua R., Queizán A., Santamaría L., Nistal M. (1993).** Cytophotometric DNA quantification in human spermatogonia of cryptorchid testes. *Journal Urology*; 149(2):382-5.
- Colvin J. S., Green R. P., Schmahl J., Capel B., Ornitz D. M. (2001a).** Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*; 104: 875–889.
- Cools M., Drop S. L., Wolfenbittel K. P., Oosterhuis J. W., Looijenga L. H. (2006).** Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocrinology Reviews*; 27(5): 468-84.
- Culty M. (2009).** Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Embryo Today*; 87:1-26.
- Cunningham B. A. (1995).** Cell adhesion molecules as morphoregulators. *Cell Biology*; 7:628-633.
- De Franca L. R., Silva V. A. S., Jr, Chiarini-Garcia H., Garcia K. y Debeljuk L. (2000).** Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*; 63 1629–1636.
- De Plaen E., De Backer O., Arnaud D. (1999).** A new family of mouse genes homologous to the human MAGE genes. *Genomics*; 55:176–184.
- Depue R. H., Pike M. C., Henderson B. E. (1983).** Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. *Journal in the National Cancer Institute*; 71(6):1151-5.



- Deansley R. (1977).** Testis differentiation in the fetal and postnatal ferret. *Journal Anatomy*; 123:589–599.
- Didier E. (1971).** The Wolffian duct induces the formation of the ostium of the Müllerian duct: demonstration in the chick embryo. *Journal Embryology*; 25(1):115-29.
- Dierichs R., Wrobel K. H., Scholling E. (1973).** Lichtund-electronmicroscopische untersuchungen and den Leidig zellen des schweines wahrend der postnatalen entwicklung. *Zellforsch*; 143:207–227.
- Dolci S., Williams D. E., Ernst M. K., Resnick J. L., Brannan C. I., Lock L. F., Lyman S. D., Boswell H. S., Donovan P. J. (1991).** Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*; 352: 809–811.
- Dolci S., Pellegrini M., Di Agostino S., Geremia R., Rossi P. (2001).** Signaling through extracellular signal-regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. *Journal Biology Chemistry*; 276 40225–40233.
- Edelman G. M. Crossin K. L. (1991).** Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Biochemistry*; 60:155-190.
- Elder D. E. (1988).** Dysplastic nevus syndrome-biological significance. *Oncology*; 15(6):529-40.
- Ehrmeyers S. L., Joiner B. L., Kahan L., Larson F. C., Metzzenberg R. L. (1978).** A cancer-associated, fast, homoarginina-sensitive electrophoretic from of serum alkaline phosphatase. *Cancer Research*: 38(3):599-601.
- Evans M. J., Kaufman M. H. (1981).** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*; 292:154–156.
- Ezeh U. I., Turek P. J., Reijo R. A., Clark A. T. (2005).** Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer*; 104:2255–2265.
- Fabre-Roviller Virginie, Vincent Muczynski, Romain Lambrot, Charlotte Lécureuil, Hervé Coffigny, Catherine Pairault, Delphine Moison, Gaelle Angenard, Mariana Bakaiska, Anne Marie Courtot, René Frydman and René Habert. (2009).** Ontogenesis of testicular fuction in humans. *Folia histochemica et cytobiologica* Vol. 47. No. 5 pp. S19-S24.
- Ferlin A., Arredi B., Zuccarello D., Garolla A., Selice R., et al. (2006).** Paracrine and endocrine roles of insulin-like factor 3. *Journal Endocrinology*; 29: 657–664.
- Fernández S. L., Russell D. W., Hurlin P. J. (2007).** Development of human gene receptor cell lines using rAAV mediated homologous recombination. *Biological Procedures Online*; 9:84-90.
- Ford A. B., Hellerstein H. K., Turell D. J. (1959).** Work and heart disease. II. A physiologic study in a steel mill. *Circulation*; 20: 537-48.
- Foresta C., Zuccarello D., Garolla A, and Ferlin A. (2008).** Role of Hormones, Genes, and Environment in Human Cryptorchidism. *Endocrine Reviews*; 29(5):560–580.
- Foucault C., Delmont J., Brouqui P. (2002).** Malaria. *Reviews*; 52(9):1009-15.
- Fukuda T., Hedinger C., Groscurth P. (1975).** Ultrastructure of developing germ cells in the fetal human testis. *Cell Tissue Res*; 161:55–70.



- García Jiménez Ricardo J. y Villalobos Bastos Silvia (1984).** ISOENZIMAS, Revista Medica de Costa Rica; 487, 57-61.
- Gassei K., y Schlatt S. (2007).** Testicular morphogenesis: comparison of in vivo and in vitro models to study male gonadal development. Annals Academy of Sciences; 1120:152-67.
- Gaskell T. L., Esnal A., Robinson L. L., Anderson R. A. y Saunders P.T. (2004).** Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. Biology Reproduction; 71, 2012–2021.
- Gideke G., Wolf M. M, Krüger O., Werner R. F., Cirac J. I. (2003).** Entanglement of formation for symmetric Gaussian states. Physical Reviews; 91(10):107901.
- Ginsburg M., Snow M. H., McLaren A. (1990).** Primordial germ cell in the mouse embryo during gastrulation. Development; 110(2):521-8.
- Giwerzman A., Bruun E., Frimodt-Moller C., Skakkebaek N. E. (1989).** Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism. Journal Urology; 142 (4):998-1001.
- Gnessi L., Emidi A., Jannini E. A., Carosa E., Maroder M., Arizzi M., Ulisse S., Spera G. (1995).** Testicular development involves the spatiotemporal control of PDGFs and PDGF receptors gene expression and action. Journal Cell Biology; 131:1105–1121.
- Guitton N., Brouazin-Jousseume V., Dupaix A., Jégou B., Chenal C. (1999).** Radiation effect on rat Sertoli cell function in vitro and in vivo. Journal Radiation Biology; 75(3):327-33.
- Guitton N. Touzalin A. M. Sharpe R. M. Cheng C. Y. Pinon-Lataillade G. Meritte H. Chenal C. and Jégou B. (2000).**Regulatory influence of germ cells on Sertoli cell function in the prepubertal rat after acute irradiation of the testis. Journal of Andrology; 23 332–339.
- Godin I., Deed R., Cooke J., Zsebo K., Dexter M., Wylie C. C. (1991).** Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. Nature; 52: 807–809.
- Gómez G. E. (2004).** Electroconvulsive therapy: present and future. Issues Ment Health Nurs; 25 (5):473-86.
- Group J. R. H. C. S. (1986).** Cryptorchidism: an apparent substantial increase since 1960. Jonh Radcliffe Hospital Cryptorchidism Study Group. Med Journal; 293: 1401-1404.
- Haider S. G., Laue D., Schwochau G., Hilscher B. (1995).** Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis. Journal Anatomy Embryology; 100:535–541.
- Haider S. G., Passia D., Overmeyer G. (1986).** Studies on the fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. Acta Histochemical; 32:197–202.
- Haider S. G., Servos G. (1998).** Ultracytochemistry of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. Anatomy Embryology; 198:101–110.
- Hardy M. P., Kelce W. R., Klinefelter G. R., Ewing L. L. (1990).** Differentiation of Leydig cell precursors in-vitro: a role for androgen. Endocrinology; 127:488–490.
- Hedinger E. (1982).** Histopathology of undescended testes. Journal Pediatric; 139 (4):266-71.



- Hilscher W. (1991).** The genetic control and germ cell kinetics of the female and male germ line in mammals including man. *Human Reproduction*; 6:1416–1425.
- Hoei-Hansen C. E., Holm M., Rajpert- De Meyts E., Skakkebaek N. E. (2003).** Histological evidence of testicular dysgenesis in contralateral biopsies from 218 patients with testicular germ cell cancer. *Journal Pathology*; 200(3): 370-4.
- Hoei-Hansen C.E., Nielsen J.E., Almstrup K., Brask Sonne S., Græm N., Skakkebæk N.E., Leffers H. and Rajpert-De Meyts E. (2004b).** Transcription factor AP-2 α is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. *Clin Cancer Res*; 10:8521–8530.
- Hoei-Hansen C.E., Almstrup K., Nielsen J.E., Brask Sonne S., Graem N., Skakkebaek N.E., Leffers H., Rajpert-De Meyts E. (2005).** Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopathology*; 47:48-56.
- Hoei-Hansen C. E., Rajpert De- Meyts E., Skakkebaek N. E. (2011).** Increased risk of carcinoma in situ in patiente with testicular germ cell cancer with ultrasonic microlithiasis in the contralateral testicle. *Journal Urology*; 170 (4):1163-7.
- Honecker F., Stoop H., de Krijger R. R., Lau Y. F. C., Bokemeyer C. y Looijenga L. H. (2004).** Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *Journal Pathology*; 203:849–857.
- Hosie, S., Wessel, L. y Waag, K. L. (1999).** Could testicular descent in humans be promoted by direct androgen stimulation of the gubernaculum testis. *Journal Pediatric*; 9, 37–41.
- Hotson J., Braun D., Herzberg W., Boman D. (1997).** Acute vestibular syndrome. *Journal Medical*; 339(10):680-5.
- Hughes I. A. y Acerini C. L. (2008).** Factors controlling testis descent. *Journal Endocrinology*; 1:S75-82.
- Huhtaniemi I. T., Rajaniemi H. J., Catt K. J. (1986).** Kinetic and autoradiographic studies on binding of hCG to the testicular LH receptors of neonatal rats. *Journal Reproduction Fertil*; 78:73–82.
- Husmann D. A. y Levy J. B. (1995).** The hormonal control of testicular descent. *Journal Andrology*; 16(6):459-63.
- Hutson J. M; y P. K. Donahue. (1986).** The hormonal control of testicular descent. *Endocrinology Reviews*; 7:270-283.
- Hutson, J. M., Hasthorpe, S., Heyns, C. F. (1997).** Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocrinology Reviews*; 18, 259–280.
- Hutson, J. M. (1985).** A biphasic model for the hormonal control of testicular descent. *Lancet* 2, 419–421.
- Hutson J. M., Hasthorpe S. (2005).** Testicular descent and cryptorchidism: the state of the art in 2004. *Journal of pediatric*. 40, 297-302
- Hutson J. M. y Clarke M. C. (2007).** Current management of the undescended testicle. *Pediatric Review*; 16(1):64-70.
- Hutson S. L., Mui E., Kinsley K., Witola W. H., Behnke M. S., El Bissati K., Muench S. P., Rohrman B., Liu S. R., Wollmann R., Ogata Y., Sarkeshik A., Yates J. R., McLeod**



- R. (2010).** Analysis of morbidity and mortality in surgical management of craniosynostosis. *Journal Craniofacial Genetics*; 23(5):1256-61.
- Ivell R. y Hartung S. (2003).** The molecular basis of cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction*; 9,175–181.
- Izquierdo M. A., Van der Valk P., Van Ark-Otte J., Rubio G., Germa-Lluch J. R., Ueda R., Scheper R. J., Takahashi T., Giaccone G. (1995).** Differential expression of the c-kit proto-oncogene in germ cell tumours. *Journal Pathology*; 177(3):253-8.
- Jakob H. (1984).** Stem cells and embryo-derived cell lines: tools for study of gene expression. *Cell Differentiation*; 15:77–80.
- Jeans A. F., Frayling I., Jasani B., Side L., Blesing C., Ansorge O. (2005).** Cerebral primitive neuroectoderm tumor in an adult with a heterozygous MSH2 mutation. *Review Clinical Oncology*; 6(5):295-9.
- Jégou B. (1992).** The Sertoli cell. *Clinical Endocrinology and Metabolism*; 6 273–311.
- Jégou B. and Sharpe R. M. (1993).** Paracrine mechanisms in testicular control. In *Molecular Biology of the Male Reproductive System*; 271–310 Ed.
- Jong A., Dondorp W. J., Krumeich A., Boonekamp J. (2005).** The scope of prenatal diagnosis for women at increased risk for aneuploidies: views and preferences of professionals and potential users. *Community Genetics*.
- Josso N, Rey R. (1998).** Sexual differentiation. *Clinical Endocrinology*, 2.a ed. Oxford: Blackwell Science; pp. 787-794.
- Jørgensen N., Rajpert-De Meyts E., Graem N., Müller J., Giwercman A. and Skakkebaek N.E. (1995b).** Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Laboratorio of Investigation*; 72:223–231.
- Josso N., di Clemente N. and Guedard L. (2001).** Anti-Mullerian hormone and its receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 179 25–32.
- Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., Pesce M., Gentile L., Boiani M., Lomelí H., Nagy A., McLaughlin K. J., Schöler H. R., Tomilin A. (2004).** Oct4 is required for primordial germ cell survival. *Reproduction*; 5(11):1078-83.
- Kerr C. L., Hill C. M., Blumenthal P. D., Gearhart J. D. (2008).** Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal ovary. *Human Reproduction*; 23:589–599.
- Keshet E., Lyman S. D., Williams D. E., Anderson D. M., Jenkins N. A., Copeland N. G., Parada L. F. (1991).** Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO Journal*; 10: 2425–2435.
- Kierszenbaum A. L. (1994).** Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocrinology Reviews*; 15(1):116-34.
- Klonish T., Fowler P. A., Hombach-Klonisch S. (2004).** Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Development Biology*; 270(1):1-18.
- Kraft H. J., Mosselman S., Smits H. A., Hohenstein P., Piek E., Chen Q., Artzt K., van Zoelen E. J. (1996).** Oct-4 regulates alternative platelet-derived growth factor alpha receptor gene promoter in human embryonal carcinoma cells. *Journal Biology Chemistry*; 271(22):12873-8.



- Kristensen A. T., Wiig J. N., Larsen S. G., Giercksky K. E., Ekstrom P. O. (2008).** Molecular detection (k-ras) of exfoliated tumour cells in the pelvis is a prognostic factor after resection of rectal cancer. *Biology Molecular Cancer*; 27.8:213.
- Korkola J. E., Houldsworth J., Bosl G. J., Chaganti R. S. (2009).** Molecular events in germ cell tumours: linking chromosome-12 gain, acquisition of pluripotency and response to cisplatin. *Journal Urology*; 104(9 Pt B):1334-8.
- Korkola J. E. (2011).** Cancer genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*; 474(7353):609.
- Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ (2002).** INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *Journal Biology Chemistry*; 277:31283–31286.
- Kurpisz M., Havrylux A., Nakonechnyj A., Chopyak V, Kamieniczna M. (2010).** Cryptorchidism and long-term consequences. *Reproduction Biology*; 10(1):19-35.
- Lacham-Kaplan Orly (2004).** In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse. *Reproduction*; 128.147-152.
- Laslett A.L., Li L.H., Jester W.F., Jr and Orth J.M. (2000).** Thyroid hormone downregulates neural cell adhesion molecule expression and affects attachment of gonocytes in Sertoli cell-gonocyte co-cultures. *Endocrinology*; 141 1633–1641
- Lawrence T. S., Davis M. A., Maybaum J., Mukhopadhyay S. K., Stetson P. L., Normolle D. P., McKeever P. E., Ensminger W. D. (1992).** The potential superiority of bromodeoxyuridine to iododeoxyuridine as a radiation sensitizer in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Research*; 52(13):3698-704.
- Lee P. A. y Coughlin M. T. (2000).** Paternity and hormone levels after unilateral cryptorchidism: association with pretreatment testicular location. *Journal Urology*; 164(5):1697-701.
- Lee P. A. y Coughlin M. T. (2001).** Fertility after bilateral cryptorchidism. Evaluation by paternity, hormone, and semen data. *Hormone Research*; 55(1):28-32.
- Lewitzky M. y Yamanaka S. (2007).** Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Biotechnology*; 18, 467-473.
- Ling-Hong L. I., Williams F., Jester J. R., Joanne Moanne M. Orth. (1998).** Expression of 140-kDa Neural Cell Adhesion Molecule in Developing Testes In Vivo and in Long-Term Sertoli Cell-Gonocyte. *Journal of Andrology*. Vol. 19.No. 3. Copyright © American Society of Andrology.
- Ling V., Neben S. (1997).** In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *Journal Cell Physiology*; 171:104–115.
- Looijenga L. H., de Leeuw H., van Oorschot M., van Gurp R. J., Stoop H., Gillis A. J., de Gouveia Brazao C. A., Weber R. F., Kirkels W. J., van Dijk T, con Linderm M., Valk P., Lajos G., Olah E., Nesland J. M., Fossa S. D., Oosterhuis J. W. (2003).** Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Research*; 63(22):7674-8.
- Looijenga L. H., Gillis A. J., Stoop H. J., Hersmus R. Oosterhuis J. W. (2007).** Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Annals Academy Sciences*; 1120:187-214.



- Lording D. W., de Kretser D. M. (1972).** Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal developmental. *Journal Reproduction Fertility*; 29: 261-269.
- Loveland K. L., Dias V., Meachem S., Rajpert-De Meyts E. (2007).** The transforming growth factor-beta superfamily in early spermatogenesis: potential relevance to testicular dysgenesis. *Journal Andrology*; 30:377–384.
- Majdic G., Saunders P. T. K., Teerds K. J. (1998).** Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17bhydroxylase, C17, 20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biology Reproduction*; 58:520– 525.
- Mancini R. E., Vilar O., Lavieri J. C., Andrada J. A., Heinrich J. J. (1963).** Development of Leydig cells in the normal human testis. A cytological, cytochemical and quantitative study. *Journal Anatomy*; 112:203–214.
- Manivet P., Soliman H. R., Callebert J., Laplanche J. L., Launay J. M., (1987).** Biochemical mechanisms in the physiopathology of migraine. *Pathology Biology*; 48(7):630-41.
- Matin M. M., Walsh J. R., Gokhale P. J., Draper J. S., Bahrami A. R., Morton I., Moore H. D., Adrews P. W. (2004).** Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells embryonic carcinoma cells. *Stem Cells*; 22(5):659-68.
- Martineau J. K. Nordqvist, C. Tilmann, R. Lovell-Badge y B. Capel (1997).** “Male-specific cell migration into the development and sexual differentiation”. *Cell*; 77:958-968.
- Martin G. R. (1981).** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Academy Science*; 78:7634–7638.
- Massart F. y Saggese G. (2010).** Morphogenetic targets and genetics of undescended testis. *Sex Development*; 4(6):326-35.
- Matsui Y., Toksoz D., Nishikawa S., Nishikawa S., Williams D., Zsebo K., Hogan B. L. (1991).** Effect of steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*; 353:750–752.
- Maymon B. B. S., Yogev L., Paz G., Kleiman S. E., Schriber L., Botchan A., Hauser R. y Yavetz H. (2002).** Sertoli cell maturation in men with azoospermiaof different etiologies. *Fertility and Sterility*; 77 904–909.
- Maymon B. B., Paz G., Yogev L., Hauser R., Schreiber L., Botchan A., Yavetz H. (2000).** Immunohistochemical identification of testicular germ cells-preliminary report. *Harefuah*; 139(5-6):179-82.
- McCoshen J. A., McCallion K. J. (1975).** A study of the primordial germcells during their migratory phase in steel mutant mice. *Experientia*; 31: 589–590.
- McGlynn K. A., Quraishi S. M., Graubard B.I., Weber J. P., Rubertone M. V., Erickson R. L. (2008).** Persistent organochlorine pesticides and risk of testicular germ cell tumors. *Journal Cancer*; 100(9):663-71.
- McLaren T. T., Foster P. M. D. and Sharpe R. M. (1993).** Effect of age on seminiferous tubule protein secretion and the adverse effects of testicular toxicants in the rat. *International Journal of Andrology*; 16 370– 379



- Means A. R., Fakunding J. L., Huckins C., Tindall D. J. and Vitale R. (1976).** Folliclestimulating hormone, the Sertoli cell and spermatogenesis. *Recent Progress in Hormone Research*; 32 477–527.
- Mendis C. H. y Siril A. (2001).** Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis. *Tennessee. Biology of Reproduction*; 65, 660–671
- Mendis-Handagama S. M. L. C., Risbridger G. P., de Kretser D. M. (1987).** Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int Journal Andrology*; 10:525–534.
- Merchant-Larios H. y Moreno-Mendoza N. (1998).** Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Cell Research*; 244(1):230-238.
- Michael C; Heinrich M. D; Brian P; Rubin M.D; PhD B; Jack Longley M.D y Jonathan A. (2011).** Genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: Kit activation and cytogenetic alterations. *Alianza GIST*; 44(1):30-28.
- Mininberg D. T., Rodger J. C., Bedford J. M. (1982).** Ultrastructural evidence of the onset of testicular pathological conditions in the cryptorchid human testis within the first year of life. *Journal Urology*; 128(4):782-4.
- Mitchell R. T., Cowan G., Morris K. D., Anderson R. A., Fraser H. M., Mckenzie K. J., Wallace W. H. B., Kelnar C. J. H., Saunders P. T. K., Sharpe R. M. (2008).** Germ cell differentiation in the marmoset (*Callithrix jacchus*) during fetal and neonatal life closely parallels that in the human. *Human Reproduction*; 23:2755-2765.
- Mora O. A. (1994).** Pheromonal male-induced diestrus and cyclicity in aging intact and young estrogenized female rats. *Biology Reproduction*; 50 (3):603-6.
- Morohashi K. (1997).** The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes Cells*. 2(2):95-106.
- Müller R., Bravo R., Burckhardt J., Curran T. (1984).** Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*; 312(5996):716-20.
- Nef S., Parada L. (1999).** Cryptorchidism in mice mutant from INSL3. *Nature Genetics*; 22:295-9.
- Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K. (1998).** Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*; 95:379–391.
- Niemi M. y Kormanio M. (1964).** Cell renewal in the interstitial tissue of postnatal prepubertal rat testis. *Endocrinology*; 1964; 74: 996-998.
- Nistal M. y Paniagua R. (2003).** Diagnostic value of differential quantification of spermatids in obstructive azoospermia. *Journal Andrology*; 24(5):721-6.
- Nielsen T. P., Bodfish R. E., Kabok A. (1974).** Serum digoxin and thyroid hormones. *Ann Intern Medical*; 81(1):126-7.
- Niwa K., Hashimoto M., Morishita S., Yokoyama Y., Lian Z., Tagami K., Mori H, Tamaya T. (2000).** Preventive effects of danazol on endometrial carcinogenesis in mice. *Cancer*; 158(2):133-9.
- Ofordeme K. J., Aslan A. R., Nazir T. M., Hayner-Buchan A., Kogan B. A. (2005).** Apoptosis and proliferation in human undescended testes. *Biology Journal Urology*; 96(4):634-8.



- Orth J. M. y Jester W. F. (1995).** NCAM mediates adhesion between gonocytes and Sertoli cells in co-cultures from testes of neonatal rats. *Journal of Andrology*; 16 389–399.
- Orth K., Russ D., Steiner R., Beger H. G. (1997).** Dynamic interstitial laser application for therapy of secondary liver tumors. An animal experiment study. *Chirurg*; 68(12):1268-73.
- Orth J. M., Gunsalus G. M. y Lamperti A. A. (1988).** Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid numbers in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*; 122 787–794.
- Orth J. M., Jester W. F., Li L. H y Laslett A. L. (2000).** Gonocyte–Sertoli cell interactions during development of the neonatal rodent testis. *Developmental Biology*; 50 103–124.
- O’Shaughnessy P. J., Baker P., Sohnius U., Haavisto A. M., Charlton H. M., Huhtaniemi I. (1998).** Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology*; 139:1141–1146.
- O’Shaughnessy P. J., Abel M., Charlton H. M., Hu B., Johnston H., et al. (2007b).** Altered expression of genes involved in regulation of vitamin A metabolism, solute transportation, and cytoskeletal function in the androgen-insensitive tfm mouse testis. *Endocrinology*; 148: 2914–2924.
- Osmuro (2004).** Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. *Cancer (IARC)*; 14-18.
- Osterhuis j. w., Looijenga L. H., Hutschemaekers G. J. (2005).** Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Review Cancer*; 5(3):210-22.
- Overbeek P. A., Gorlov I. P., Sutherland R. W., Houston J. B., Harrison W. R., Boettger-Tong H. L., Bishop C. E., Agoulnik A. I. (2001).** A transgenicinsertion causing cryptorchidism in mice. *Genetics*; 30:26–35.
- Ozen H., Ayhan A., Esen A., Ergen A., Dogan A., Ruacan S, Remzi D. (1989).** Histopathological changes in adult cryptorchid testes. *Journal Urology*; 63(5):520-1.
- Palmero S., Prati M., Bolla F. y Fugassa E. (1995).** Tri-iodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. *Journal of Endocrinology*; 145 355–362
- Paniagua R. y Nistal M. (1984).** Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. *Journal Anatomy*; 139(Part 3):535–552.
- Panno M. L., Salerno M., Lanzino M., De Luca G., Maggiolini M., Straface S. V., Prati M., Palmero S., Bolla E. y Fugassa E. (1995).** Follow-up study on the effects of thyroid hormone administration on androgen metabolism of peripubertal rat Sertoli cells. *Journal of Endocrinology*; 132 236–241.
- Pauls R. N., Kleeman S. D., Karram M.M. (2005).** Female sexual dysfunction: principles of diagnosis and therapy. *Obstet Gynecology*; 60(3):196-205.
- Pauls K., Schorle H., Jeske W., Brehm R., Steger K., Werner N., Büttner R., Zhou H. (2006).** Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. *Human Reproduction*; 21(2):397-404.
- Pagano C. C. (2000).** The role of the inertia tensor in kinesthesia. *Critical Reviews*; 28(1-2):231-6.
- Pomero F. M. y Arrondo J. L. (1994).** Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Molecular Biology*; 72(4):367-405.



- Paranko J., Foidart J. M., Pelliniemi L. J. (1985).** Basement membrane in differentiating mesonephric and paramesonephric ducts of male and female rat fetuses. *Differentiation*; 29 (1):39-49.
- Paranko J., Kallajoki M. Pelliniemi L. J., Lehto V. P., Virtanen I. (1986).** Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Development Biology*; 117(1): 35-44.
- Park S. J. (2005).** A study of fragment- based protein structure prediction: biased fragment replacement for searching low-energy conformation. *Genome Inform*; 16(2):104-13.
- Perrett R. M., Turnpenny L., Eckert J. J. (2008).** The early human germ cell lineage does not express SOX2 during in vivo development or upon in vitro culture. *Biology Reproduction*; 78:852–858.
- Pesce M., Farrace M. G., Piacentini M., Dolci S., De Felici M. (1993).** Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development*; 118: 1089–1094.
- Petersen C y Söder O. (2006).** The Sertoli cell – a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research*; 66: 153–161.
- Pinczowski D., McLaughlin J. K., Läckgren G., Adami H. O., Persson I. (1991).** Occurrence of testicular cancer in patients operated on for cryptorchidism and inguinal hernia. *Journal Urology*; 146(5):1291-4.
- Polakis P. (2000).** Wnt signaling and cancer. *Genes Development*; 14(15):1837-51.
- Plant T. M. y Marshall G. R. (2001).** The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocrine Reviews*; 22 764–786.
- Rajpert-De Meyts E. y Skakkebaek N. E. (1993).** The possible role of sex hormones in the development of testicular cancer. *Urology*; 23(1):54-9.
- Rajpert- De Meyts E. y Skakkebaek N. E. (1998a).** Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia. *APMIS*; 106(1):198-204.
- Rajpert-de Meyts E., Jorgensen N., Graem N., Muller J., Cate R. L. y Skakkebaek N. E. (1999).** Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 84 3836–3844.
- Rajpert-De Meyts E., Jacobsen G. K., Bartkova J., Aubry F., Samson M., Bartek J., Skakkebæk N. E. (2003b).** The immunohistochemical expression pattern of Chk2, 19-INK4d, 53, MAGE–A4 and other selected antigens provides new evidence for the premeiotic origin of spermatocytic seminoma. *Histopathology*; 42:1–10.
- Rajpert-De Meyts E., Hanstein R., Jørgensen N., Græm N., Vogt P. H. and Skakkebæk N. E. (2004).** Developmental expression of the POU5F1 (OCT-3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Human Reproduction*; 19:1338–1344.
- Rajpert-De Meyts E. (2006).** Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Human Reproduction*; 12:303-323.
- Regadera J., Codesal J., Paniagua R., Gonzalez-Peramato P., Nistal M. (1991).** Immunohistochemical and quantitative study of interstitial and intratubular Leydig cells



- in normal men, cryptorchidism, and Klinefelter's syndrome. *Journal Pathology*; 164(4):299-306.
- Regadera J., Martínez- García F., González-Peramato P., Serrano A., Nistal M., Suárez-Quian C. (2001).** Androgen receptor expression in Sertoli cells as a function seminiferous tubule maturation in the human cryptorchid testis. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*; 86(1):413-21.
- Rey R., Belville C., Nihoul-Fekete C. (1999).** Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimullerian hormone measurement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 84 627–631
- Rey R., Mebarki F., Forest M. G., Mowszowicz I., Cate R. L., Morel Y., Chaussain J. L. y Josso N. (1994).** Anti-mullerian hormone in children with androgen insensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 79 960–964.
- Rey R. y Josso N. (1996).** Regulation of testicular anti-Müllerian hormone secretion. *Journal Endocrinology*; 135(2):144- 152.
- Ring H. A., Heller A. J., Farr I. N., Reynolds E. H. (1990).** Vigabatrin: rational treatment for chronic epilepsy. *Journal Neurology*; 53(12):1051-5.
- Risbridger G. P. y Davies A. P. (1994).** Isolation of rat Leydig cells and precursor forms after administration of ethane dimethane sulphonate. *Journal Physiology*; 266:E975–E979.
- Risk M. C. y Masterson T. A. (2010).** Intratubular germ cell neoplasm of the testis and bilateral testicular tumors: clinical significance and management options. *Journal Urology*; 26(1):64-71.
- Robinson L. L., Gaskell T. L., Saunders P. T. y Anderson R. A. (2001).** Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonads. *Molecular Human Reproduction*; 7:845–852.
- Rodríguez R. T; Velkey J. M., Lutzco C., Seerke R., Kohn D. B., O'Shea K. S., y Firpo M. T. (2007).** Manipulation of Oct4 levels cells results in induction of differential cell types. *Biology Medical*; 232, 1368-1380.
- Rooij D. G. (2001).** Proliferation and differentiation spermatogonial stem cells. *Reproduction*; 121(3):347-54.
- Roosen-Runge E. C. y Anderson D. (1959).** The development of the interstitial cells in the testis of albino rat. *Acta Anatomic*; 1959; 37: 125-137.
- Rossant J. y Papaioannou V. E. (1984).** The relationship between embryonic, embryonal carcinoma and embryo derived stem cells. *Cell Differentiation*; 15:155–161.
- Rosansky S. L. y Bloom S. J. (1995).** Carcadian blood pressure variation versus renal function. *Journal Kidney Dis*; 26(5):716-21.
- Russell L. D., Ettlín R. A., Sinha Hikim A. P. y Clegg E. D. (1990).** Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press Eds. Clearwater, FL.
- Russell L. D., de Franca L. R., Hess R. y Cooke P. (1995).** Characteristics of mitotic cells in developing and adult rat testes with observations on cell lineage. *Tissue Cell*. 27:105–128.
- Santamaría L., Martínez-Onsurbe P., Paniagua R., Nistal M. (1990).** Laminin, type IV collagen, and fibronectin in normal and cryptorchid human testes. An immunohistochemical study. *Journal Andrology*, 13(2):135-46.



- Saito H., Tsujitani S., Oka S., Kondo A., Ikeguchi M., Maeta M., Kaibara N. (2000).** An elevated serum level of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) significantly correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Research*; 10(6B):4489-93.
- Schmahl J. E. M., Eicher L. L., Washburn y Capel B. (2000).** "Sry Induces cell Proliferation in Mouse Gonad", *Development*; 1127: 65-73.
- Schopperle W. M. y Dewolf W. C. (2007).** The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma. *Stem Cells*; 25:723- 730.
- Setchell B. P., Plöen L. y Ritzen E. M. (2001).** Reduction of long-term effects of local heating of the testis by treatment of rats with a GnRH agonist and an anti-androgen. *Reproduction*; 122(2):255-63.
- Setchell B. P., Pakarine P. y Huhtaniemi I. (2002).** How much LH do the Leydig cells see?. *Journal Endocrinology*; 175(2):375-82.
- Seki T. y Arai Y. (1993).** Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neuroscience Research*; 17:265-290.
- Sharpe R. M., Millar M. R. y McKinnell C. (1993).** Relative roles of testosterone and the germ cell complement in determining stage-dependent changes in protein secretion by isolated rat seminiferous tubules. *International Journal of Andrology*; 16 71-81.
- Sharpe R. M. (1994).** Regulation of spermatogenesis. In *The Physiology of Reproduction 2nd Edn*. pp 1363-1434 Eds E. Knobil and JD Neill. Raven Press, New York.
- Sharpe R. M., McKinnell C., Kivlin C. y Jane S. Fisher. (2003).** Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125, 769-784.
- Shan L. X. y Hardy M. P. (1992).** Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinology*; 131:1107-1114.
- Shin D. M., Glisson B. S., Khuri F. R., Ginsberg L., Lawhorn K., Hong W. K. y Loppman S. M. (1997).** Recent advances in paclitaxel-containing chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Semin Oncology*; 24(6):S19-33-S19-37.
- Sieweke M. H y Graf T. (1998).** A transcription factor party during blood cell differentiation. *Development*; 545-551.
- Sigg C. y Hedinger C. (1984).** Morphometric and histologic studies of testicular biopsies in obstructive azoospermia. *Schweiz Medical Wochenschr*; 114(52):1942-50.
- Sinha Hikim A. P. y Swerdloff R. S. (1999).** Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reproduction*; 4:38-47.
- Slowikowska H. J., Romer T. E. y Kula K. (2003).** Neoplastic potential of germ cells in relation to disturbances of gonadal organogenesis and changes in karyotype. *Journal Andrology*; 24(2):270-8.



- Slowikowska H. J., Walczak-Jedrzejowska R., Kula P., Oszukowska E., Marchlewska K. y Wrancz J. K. (2005).** Physiological significance of estrogens in men-breakthrough in endocrinology. *Endocrinology*; 56(3):314-21.
- Söder O. (2007).** Sexual dimorphism of gonadal development. *Endocrinology Metabolism*; 21(3):381-91.
- Spencer P. S. y González J. P. (2003).** Antinociceptive activity of opiates in the presence of the antidepressant agent nomifensine. *Neuropharmacology*; 19(7);613-8.
- Steger K., Rey R., Kliesch S., Louis F., Schleicher G. y Bergmann M. (1996).** Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *Journal of Andrology*; 19 122–128.
- Steinberger A. (1991).** Effects of temperature on the biochemistry of the testis. *Medical Biology*; 286:33-47.
- Stoop H., Honecker F., Cools M., de Krijger R., Bokemeyer C. y Looijenga L. H. (2005).** Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Human Reproduction*; 20(6):1466-76.
- Stoop H., Honecker F., van de Geijn G. J., Gillis A. J., Cools M. C., de Boer M., Bokemeyer C., Wolffenbuttel K. P., Drop S. L., de Krijger R. R., Dennis N., Summersgill B., McIntyre A., Shipley J., Oosterhuis J. W. y Looijenga L. H. (2008).** Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells. *Journal Pathology*; 216(1):43-54.
- Strohmeyer T., Reissmann P., Cordon-Cardo C., Hartmann M., Ackermann R. y Slamon D. (1991).** Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors. *Academy Science*; 88(15):6662-6.
- Strohmeyer T., Reese D., Press M., Ackerman R., Hartmann M. y Slamon D. (1995).** Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *Journal Urology*; 153:511–515.
- Skakkebaek N. E. (1972).** Possible carcinoma in-situ of the testis. *Lancet*; 2(7776):516-7.
- Skakkebaek N. E. Berthelsen J. G., Giwercman A. y Müller J. (1987).** Carcinoma in- situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Journal Andrology*; 10(1):19-28.
- Taskinen S. y Wikstrom S. (1997).** Effect of age operation, location of testis and preoperative hormonal treatment on testicular growth after cryptorchism. *Journal Urology*; 158(2):471-3.
- Taipale J. y Beachy P. A. (2001).** The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature*; 411(6835):349-54.
- Teerds K.J. (1996).** Regeneration of Leydig cells after depletion by EDS: a model for postnatal Leydig cell renewal. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds.), *The Leydig Cell*. Vienna, IL: Cache River Press; 203–220.
- Tilman C. y Capel B. (1999).** Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development*; 126(13):2883-90.
- Tres L. L. y Kierszenbaum A. L. (2005).** The ADAM-integrin-tetraspanin complex in fetal and postnatal testicular cords. *Birth Defects Research Embryo Today*; 75:130–141.



- Turner K. J., Macpherson S., Millar M. R., McNeilly A. S., Williams K., Cranfield M., Groome N. P., Sharpe R. M., Fraser H. M. y Saunders P. T. K. (2002). Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *Journal of Endocrinology*; 172 21–30.
- van de Wetering M., Sancho E., Verweij C., de Lau W., Oving I., Hurlstone A., van der Horn K., Battle E., Coudreuse D., Haramis A. P., Tjon-Pon-Fong M., Moerer P., van den Born M., Soete G., Pals S., Eilers M., Medema R. y Clevers H. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*; 111(2):241-50.
- Vergouwen R. P., Jacobs S. G. y Huiskamp R. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of Reproduction Fertility*. 93:233–243.
- Vigueras R. M., Moreno-Mendoza N., Reyes G. y Merchant-Larios H. (2003). Androgen receptor and calcitonin gene-related peptide in neurons of the genitofemoral nerve during testicular descent induced with human chorionic gonadotropin. *Archives of Medical Research*; 34(3):166-70.
- Vigueras R.M., Reyes G., Moreno-Mendoza N. y Merchant-Larios H. (2004). Gubernacular fibroblast express the androgen receptor during testis descent in cryptorchid rats treated with human chorionic gonadotrophin. *Urology Research*; 32(6):386-90.
- Virtanen H. E., Bjerknes R., Cortes D., Jørgensen N., Rajpert- De Meyts E., Thorsson A. V., Thorup J. y Main K. M. (2007). Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatrica*. 96:611-6.
- Virtanen H. E. y Toppari J. (2008). Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Human Reproduction*; 14 49-58.
- von der Maase H., Rørth M., Walbom-Jørgensen S., Sørensen B. L., Christophersen I. S., Hald T., Jacobsen G. K., Berthelsen J.G. y Skakkebaek N. E. (1986). Carcinoma in situ of contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients. *Medical Journal*; 293(6559);1398-401.
- Wang E. T., Moyzis R. K. y Yu F. (2007). Genetic evidence for ongoing balanced selection at human DNA repair genes ERCC8, FANCC and RAD51C. *Mutat Research*; 616(1-2):165-74.
- Warne G. L. y Zajac J.D. (1998). Disorders of sexual differentiation. *Endocrinology Metab. Clin. North America*; 27: 945-967.
- Wartenberg H. (1976). Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of the “Gonia”. *Andrologia*; 8:117–130.
- Waring A., Wallace H. Kelnar C. y Sharpe R. (2000) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood.
- Wilson S. P., Slepatis R., Chang K. J., Kirshner N. y Viveros O. H. (1981). Differential secretion of opioid peptides and catecholamines from cultured cells of human pheochromocytoma tumor. *Life Science*; 29(22);2257-64.
- Winter B. A. y Alberts J. (2011). Adjuvant (post-surgery) chemotherapy for early stage epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database System Reviews*; 3:CD004706.
- Witschi E. (1948). Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal fold. *Carnegie Inst Wash Contribution Embryology*; 209:67-80.



- Wu J., Jester W. F., Jr, Laslett A. L., Meinhardt A. y Orth J. M. (2003).** Expression of a novel factor, short-type PB-cadherin, in Sertoli cells and spermatogenic stem cell of the neonatal rat testis. *Journal Endocrinology*; 176:381-391.
- Wu X., Schmidt J. A., Avarbock M. R., Tobias J. W., Carlson C. A., Kolon T. F., Ginsberg J. P. y Brinster R. L. (2009).** Prepuberal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Academy Science*; 106:21672-21677.
- Wylie C. (1999).** Germ cells. *Cell*; 96(2):165-74.
- Yan W., Suominen J. y Toppari J. (2000).** Stem cell factor protects germ cells from apoptosis *in vitro*. *Journal Cell Science*; 113:161–168.
- Yamaguchi K., Shirahane K., Nakamura M., Su D., Konomi H., Motoyama K., Sugitani A., Mizumoto K. y Tanaka M. (2005).** Frozen section and permanent diagnoses of the bile duct margin in gallbladder and bile duct cancer. *HPB*; 7(2):135-8.
- Yamamoto K., Tojo A., Aoki N. y Shibuya M. (1993).** Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene. *Cancer Science*; 84:1136–1144.
- Yasuda H., Galli S. J. y Geissler E. N. (1993).** Cloning and functional analysis of the mouse c-kit promoter. *Biochemical Biophysics Research*; 191:893–901.
- Yen P. H. (2004).** Putative biological functions of the DAZ family. *Int. Journal Andrology*; 27:125–129.
- Yeom Y. I., Fuhrmann G., Ovitt C. E., Brehm A., Ohbo K., Gross M., Hübner K. y Schöler H. R. (1996).** Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*; 122(3):881-94.
- Yong E. X., Huynh J., Farmer P., Ong S. Y., Sourial M., Donath S., Ting A. Y., Chow Y. y Hutson J. M. (2008).** Calcitonin gene-related peptide stimulates mitosis in the tip of the rat gubernaculum *in vitro* and provides the chemotactic signals to control gubernacular migration during testicular descent. *Journal Pediatric*; 43, 1533–1539.
- Yoshida S., Sukeno M. y Nakagawa T. (2006).** The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development*; 133:1495–1505.
- Zhao G. Q. y Garbers D. L. (2002).** Male germ cell specification and differentiation. *Development Cell*; 2:537–547.
- Zimmermann S., Steding G. y Emmen J. M. (1999).** Targeted disruption of the INSL3 gene causes bilateral cryptorchidism. *Molecular Endocrinology*; 13: 681- 91.
- Zirkin B. R. y Ewind L.L. (1987).** Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: a stereological study of cell number and ultrastructure. *Anatomy*. 1987; 219:157–163.



ANEXO I

PATOLOGÍAS CONSIDERADAS PARA EXCLUIR TEJIDOS DE LOS NIÑOS DEL GRUPO CONTROL

Anencefalia	18Q
Labio leporino y paladar hendido	Nevo de células Basales
Hipogonadismo hipogonadotrófico	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
Síndrome de insensibilidad a los andrógenos	Coffin-siris
Criptofthalmos	Enanismo distrófico
Dubowitz	Ellis-Van-Creveld
Hipopituitarismo	Distrofia de Vejiga-Cloaca
Síndrome de Kallman	Pancitopenia de Fanconi
Síndrome de persistencia de los conductos müllerianos	Hipoplasia femoral
Lowe (oculocerebrorenal)	Hidantonia fetal
Meckel-ambar	Fraser
Síndrome de Noonan	Hipoplasia pontometafisio-gorlin
Síndrome de Optiz Optiz	Hallerman-steriff
Aplasia-lupoplanipituitaria	Klinefelter y variantes
Síndrome de Prader Willi	Robinson
Síndrome de Prune Belly	Rubeola
Síndrome de Roberts	Saethre-Chotzen
Rubinstein-Taybi	Seckel
Displasia óptica-reptica	Distrofia miotónica steinert
Smith-Lemli-Opitz	Treacher-collins
Defectos enzimáticos testiculares	Trisomía 8
Triploidias	Trisomía 21 (síndrome de Down)
Trisomía 13	XYY
Trisomía 18 (Edwards)	Cerebro Hepatorenal
Wolf-hirschhorn 4P	5P (cri-du-chat)
Defectos de 5 alfa reductasa	21Q
3Q	Cirugía previa de hernioplastia
Epididimitis	
Cáncer con tratamiento de quimioterapia o radioterapia	
Parotiditis	
Fibrosis quística	
Criptorquidia adquirida	
Torsión testicular	
Varicocele	
Hipospadia	
Exposición a pesticidas	
Trauma genital	



**DIFERENCIACIÓN DE GONOCITOS Y SU ASOCIACIÓN
CON EL CARCINOMA *IN SITU* TESTICULAR.**



<i>ANTICUERPOS DE PLURIPOTENCIALIDAD</i>	<i>CARACTERÍSTICAS</i>
OCT3/4	anticuerpo monoclonal hecho en ratón y dirigido contra los aminoácido 1-134 del la proteína (sc-5279).
c-Kit	anticuerpo monoclonal hecho en ratón dirigido contra el amino terminal del receptor (sc-70457).
FA	anticuerpo policlonal hecho en ratón y dirigido contra los aminoácidos 18-317 del amino Terminal de la proteína (sc-1666261)